Redakcja naukowa

ZBIGNIEW BRZÓZKA
ELŻBIETA MALINOWSKA
WOJCIECH WRÓBLEWSKI

SENSORY CHEMICZNE i BIOSENSORY

PWN

Redakcja naukowa
ZBIGNIEW **BRZÓZKA**
ELŻBIETA **MALINOWSKA**
WOJCIECH **WRÓBLEWSKI**

SENSORY CHEMICZNE i BIOSENSORY

PWN

Projekt okładki i stron tytułowych **Lidia Michalak**

Ilustracja na okładce **Vasin Lee/Shutterstock**

Wydawca **Katarzyna Włodarczyk-Gil**

Redakcja i korekta **Urszula Pawłowska**

Koordynator ds. redakcji **Renata Ziółkowska**

Koordynator produkcji **Adam Krajewski**

Wydanie publikacji zostało dofinansowane przez Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

Skład wersji elektronicznej na zlecenie Wydawnictwa Naukowego PWN

Monika Lipiec /Woblink

Książka, którą nabyłeś, jest dziełem twórcy i wydawcy. Prosimy, abyś przestrzegał praw, jakie im przysługują. Jej zawartość możesz udostępnić nieodpłatnie osobom bliskim lub osobiście znanym. Ale nie publikuj jej w internecie. Jeśli cytujesz jej fragmenty, nie zmieniaj ich treści i koniecznie zaznacz, czyje to dzieło. A kopiując jej część, rób to jedynie na użytek osobisty.

Szanujmy cudzą własność i prawo.

Więcej na www.legalnakultura.pl

Polska Izba Książki

Copyright © by Wydawnictwo Naukowe PWN SA

Warszawa 2022

ISBN 978-83-01-22091-4

DOI: https://doi.org/10.53271/2021.012

eBook został przygotowany na podstawie wydania papierowego z 2021 r., (wyd. I)

Warszawa 2021

Wydawnictwo Naukowe PWN SA

02-460 Warszawa, ul. Gottlieba Daimlera 2

tel. 22 69 54 321, faks 22 69 54 288

infolinia 801 33 33 88

e-mail: pwn@pwn.com.pl; reklama@pwn.pl

www.pwn.pl

Spis treści

Wykaz akronimów

Słownik terminów

1. Wprowadzenie - Elżbieta Malinowska, Wojciech Wróblewski

2. Sensory elektrochemiczne
   2.1. Sensory potencjometryczne - Mariusz Pietrzak
      2.1.1 Pomiar potencjometryczny
      2.1.2 Metody analizy z wykorzystaniem sensorów potencjometrycznych
      2.1.3 Elektrody odniesienia
      2.1.4 Elektrody jonoselektywne
      2.1.5 Parametry pracy elektrod jonoselektywnych
      2.1.6 Rodzaje elektrod jonoselektywnych
      2.1.7 Miniaturyzacja elektrod jonoselektywnych
      2.1.8 Półprzewodnikowe sensory potencjometryczne
      2.1.9 Zastosowanie sensorów potencjometrycznych
   2.2. Sensory amperometryczne i woltamperometryczne - Marta Jarczewska
      2.2.1 Pomiar amperometryczny
      2.2.2 Pomiar woltamperometryczny
      2.2.3 Podstawy działania sensorów amperometrycznych i woltamperometrycznych
      2.2.4 Przykłady zastosowań
   2.3 . Sensory potencjometryczne w warunkach elektrochemicznych technik prądowych - Agata Michalska, Krzysztof Maksymiuk
      2.3.1 Wykorzystanie chronopotencjometrii
      2.3.2 Wykorzystanie metod woltamperometrycznych
      2.3.3 Wykorzystanie metod kulometrycznych
      2.3.4 Wykorzystanie metod z rejestracją sygnału optycznego

2.3.5 Perspektywy zastosowań

3. Sensory optyczne - Dorota Stadnik, Ewa Kobylska
3.1. Wprowadzenie
3.2. Zjawiska optyczne wykorzystywane w czujnikach
3.2.1 Absorpcja i odbicie promieniowania
3.2.2 Fluorescencja
3.2.3 Rozpraszanie Ramana
3.2.4 Zmiana współczynnika załamania światła
3.2.5 Interferencja światła
3.3. Konstrukcje sensorów optycznych
3.3.1 Sensory na bazie włókien optycznych
3.3.2 Sensory na bazie planarnych światłowodów
3.3.3 Sensory w mikrosystemach przepływowych
3.4. Nanomateriały i funkcjonalizacja warstw receptorowych w sensorach optycznych
3.4.1 Nanomateriały
3.4.2 Funkcjonalizacja powierzchni

4. Sensory gazowe- Jacek Gębicki, Bartosz Szulczyński, Tomasz Wasilewski
4.1. Katalityczne (temperaturowe) czujniki gazowe
4.2. Masowe czujniki gazowe
4.2.1 Mikrowagi kwarcowe
4.2.2 Czujniki z akustyczną falą powierzchniową
4.3. Optyczne czujniki gazowe
4.3.1 Czujniki pracujące w widmie podczerwieni
4.3.2 Czujnik fotojonizacyjne
4.4. Elektrochemiczne czujniki gazowe
4.4.1 Czujniki potencjometryczne
4.4.2 Czujniki amperometryczne
4.4.3 Czujniki półprzewodnikowe (konduktometryczne)
4.5. Czujniki gazowe wykorzystujące nanomateriały
4.5.1 Nanomateriały półprzewodnikowe na bazie tlenków metali
4.5.2 Nanomateriały węglowe
4.5.3 Nanomateriały polimerowe
4.5.4 Nanokompozyty biologiczne
4.5.5 Nanocząstki metali
4.6. Komercyjnie dostępne gazowe czujniki chemiczne

5. Biosensory - Marta Jarczewska

5.1. Terminologia i podstawy działania
5.2. Warstwy receptorowe biosensorów (klasy biosensorów)
5.3. Immunosensory – istotne narzędzia współczesnej diagnostyki medycznej - Agata Kowalczyk, Magdalena Bamburowicz-Klimkowska, Monika Nisiewicz, Anna M. Nowicka
5.3.1 Budowa i zasada działania immunosensora
5.3.2 Rozpoznanie antygenu przez przeciwciało – podstawą działania immunosensorów
5.3.3 Sposoby wprowadzania przeciwciała do warstwy receptorowej
5.3.4 Wizualizacja rozpoznania antygenu przez przeciwciało
5.3.5 Nanotechnologia – siła napędowa współczesnej analityki medycznej
5.3.6 Przykłady aplikacji immunosensorów w diagnostyce medycznej
5.3.7 Perspektywy i ograniczenia
5.4. Biosensory DNA i aptasensory - Marta Jarczewska, Robert Ziółkowski
5.4.1 Proces SELEX
5.4.2 Zastosowanie aptamerów i kwasów nukleinowych
5.4.3 Metody immobilizacji kwasów nukleinowych
5.4.4 Mechanizmy generowania sygnału w biosensorach elektrochemicznych z warstwą receptorową w postaci kwasów nukleinowych
5.4.5 Przykłady aptasensorów
5.4.6 Przykłady biosensorów DNA
5.5. Biosensory mikrobiologiczne - Łukasz Górski
5.5.1 Mikroorganizmy stosowane w sensorach
5.5.2 Immobilizacja mikroorganizmów na przetwornikach
5.5.3 Układy pomiarowe
5.5.4 Zastosowania biosensorów mikrobiologicznych
5.6. Biosensory enzymatyczne - Urszula Wawrzyniak
5.6.1 Układy jednoenzymowe
5.6.2 Układy wieloenzymowe

6. Sensory chemiczne wykorzystujące nanomateriały w warstwach receptorowych
6.1. Klasyfikacja i podstawowe właściwości nanomateriałów - Marcin Drozd, Aleksandra Szuplewska
6.1.1 Nanomateriały zerowymiarowe
6.1.2 Nanomateriały jednowymiarowe
6.1.3 Nanomateriały dwuwymiarowe
6.2. Warstwy receptorowe sensorów i biosensorów oparte na nanomateriałach - Marcin Drozd

6.2.1 Zastosowanie nanomateriałów w warstwach przetwornikowych i pośrednich
6.2.2 Zastosowanie nanomateriałów jako znaczników
6.2.3 Przykłady zastosowań
6.3. Mikro- i nanomateriały samodzielne jako sensory- Krzysztof Maksymiuk, Agata Michalska
6.3.1 Nanostruktury – nanocząstki jako samodzielne sensory
6.3.2 Nanowłókna jako sensory
6.3.3 Specyfika transportu analitu do sensorów nanostrukturalnych
6.3.4 Nano- i mikrosensory z różnych materiałów – otrzymywanie i właściwości
6.3.5 Nano- i mikrosensory – zastosowania

7. Układy multisensorowe – elektroniczny nos i język - Patrycja Ciosek-Skibińska
7.1. Sensory stosowane w matrycach czujnikowych
7.2. Metody rozpoznawania obrazu
7.3. Rozwiązania komercyjne i zastosowania
Podziękowania

8. Sensory chemiczne jako detektory w przepływowych układach (bio)analitycznych - Michał CHUDY, Ewa KOBYLSKA
8.1. Najważniejsze konfiguracje stosowane w analizie przepływowej
8.1.1 Wprowadzenie
8.1.2 Konstrukcja układów pomiarowych
8.1.3 Tryby pracy
8.1.4 Wykorzystanie sensorów w klasycznych układach przepływowych
8.1.5 Wykorzystanie sensorów w mikrosystemach „Lab-on-a-chip”
8.2. Zastosowania przepływowych układów (bio)analitycznych
8.2.1 Zastosowania okołomedyczne sensorów zintegrowanych z układami przepływowymi
8.2.2 Zastosowanie sensorów zintegrowanych z układami przepływowymi w badaniach środowiskowych
8.2.3 Zastosowanie sensorów zintegrowanych z układami przepływowymi w przemyśle
8.3. Podsumowanie

9. Perspektywy rozwoju sensorów chemicznych i biosensorów- Zbigniew BRZÓZKA
9.1. Kierunki rozwoju sensorów chemicznych i biosensorów
9.2. Rozwój komercjalizacji sensorów chemicznych i biosensorów

9.3. Przyszłość wykorzystania sensorów chemicznych i biosensorów w diagnostyce medycznej

10. Appendix. Sensory jako wyroby medyczne – regulacje prawne - Dorota Stadnik, Jacek Stadnik
10.1. Definicje
10.2. Klasyfikacja wyrobów medycznych
10.3. Rejestracja wyrobów medycznych

Przypisy

Wykaz akronimów

Akronim	Termin anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
0D	Zero-dimensional nanomaterials	Nanomateriały zerowymiarowe
1D	One-dimensional nanomaterials	Nanomateriały jednowymiarowe
2D	Two-dimensional nanomaterials	Nanomateriały dwuwymiarowe
A	Adenine	Adenina
Ab	Antibody	Przeciwciało
Ab-Ag	Antibody-antigen complex	Kompleks przeciwciało antygen
AChE	Acetylcholinesterase	Acetylocholinoesteraza
ADD	Arc-Discharge Deposition	Osadzanie techniką wyładowania łukowego
AFP	Alpha-FetoProtein	Alfa-fetoproteina
AFR	Air to Fuel Ration	Stosunek powietrza do masy paliwa
Ag	Antigen	Antygen
ANN	Artificial Neural Network	Sztuczna sieć neuronowa
AQMS -	Anthraquinone-2-sulfonic acid	Kwas antrachinylo-2-sulfonowy
APBA	4-Aminophenylboronic acid	Kwas 4-aminofenyloboronowy
ATP -	Adenosine triphosphate	Adenozyno-5-trifosforan
AuNPs	Au nanoparticles	Nanocząstki złota
BFIA	Batch-flow Injection Analysis	Analiza przepływowa bezpośredniego wstrzyknięcia
BLI	Bio-Layer Interferometry	Interferometria biowarstwowa
BRCA1	BReast CAncer gene 1	Gen nowotworu piersi 1

Akronim	Termin anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
BRAC2	BReast CAncer gene 2	Gen nowotworu piersi 2
BZT	Biochemical Oxygen Demand	Biochemiczne zapotrzebowanie tlenu
C	Cytosine	Cytozyna
CA125 CA15-3	Cancer Antigen 125 Cancer Antigen 15-3	Antygen nowotworowy 125 Antygen nowotworowy 15-3
CCD	Charge Coupled Device	Matryca światłoczuła
CD	Carbon Dots	Kropki węglowe
cDNA	Complementary DNA	Komplementarne DNA
CE	Capillary Electrophoresis	Elektroforeza kapilarna
CEA	Carcino-Embryonic Antigen	Antygen rakowozarodkowy
CFA	Continuous Flow Analysis	Analiza z użyciem ciągłego przepływu
CFR	Code of Federal Regulations	Kodeks Przepisów Federalnych (dotyczy regulacji żywności i leków w Stanach Zjednoczonych w ramach Agencji ds. Żywności i Leków)
CFU	Colony-Forming Unit	Jednostka tworząca kolonię
CGM	Continuous Glucose Monitoring	Ciągłe monitorowanie glukozy
CHEMFET	Chemically Modified Field Effect Transistor	Chemicznie modyfikowany tranzystor polowy
CKMB	Creatine Kinase fraction	Frakcja enzymu kinazy kreatynowej
CL-LFA	Chemiluminescence-based lateral flow assay	Chemiluminescencyjny test metodą przepływu bocznego
CMOS	Complementary Metal-Oxide-Semiconductor	Półprzewodnikowy komplementarny układ scalony
CNTs	Carbon Nanotubes	Nanorurki węglowe
CPs	Conductive Polymers	Polimery przewodzące
CRP	C-Reactive Protein	Białko C-reaktywne
CT	Charge-Transfer complex	Kompleks z przeniesieniem ładunku
CV	Cyclic Voltammetry	Woltamperometria Cykliczna
CVD	Chemical Vapor Deposition	Chemiczne osadzanie z fazy gazowej
CYFRA21-1	Cytokeratin 19 fragment	Fragment cytokeratyny 19

Akronim	Termin anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
DDI	DNA-Directed Immobilization	Bezpośrednie unieruchamianie krótkich fragmentów DNA
DET	Direct Electron Transfer	Bezpośrednie przeniesienie elektronów
DGW	Lower flammability limit	Dolna granica wybuchowości
DNA	Deoxyrybonucleic Acid	Kwas deoksyrybonukleinowy
ECL	ElectroChemiLuminescence	Zjawisko elektrochemiluminescencji
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide hydrochloride	Chlorowodorek N-(3-dimetyloamino-propylo)-N′-etylokarbodiimidu
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	Test immunoenzymatyczny / test immunoenzymosorpcyjny
ER	Estrogen	Estrogen
Fab	Antigen-binding fragment of antibody	Fragment przeciwciała wiążący antygen
FAD	Oxidized form of flavin-adenine dinucleotide	Forma utleniona dinukleotydu flawinoadeninowego
FADH2	Reduced form of flavin-adenine dinucleotide	Forma zredukowana dinukleotydu flawinoadeninowego
FAM	6-Carboxyfluorescein	6-karboksylofluoresceina
Fc	Fragment crystallizable of antibody	Fragment przeciwciała krystalizowany
FDA	Food and Drug Administration	Agencja ds. Żywności i Leków
FET	Field-Effect Transistor	Tranzystor polowy
FIA	Flow Injection Analysis	Wstrzykowa analiza przepływowa
FIM	Fixed Interference Method	Metoda roztworów mieszanych
FLISA	Fluorescence-Linked ImmunoSorbent Assay	Test immunofluorescencyjny
FRET	Fluorescence/Förster Resonance Energy Transfer	Fluorescencyjny/Försterowski rezonansowy transfer energii
G	Guanine	Guanina
GC	Gas chromatography	Chromatografia gazowa
GDH	Glucose dehydrogenase	Dehydrogenaza glukozowa
GGW	Upper flammability limit	Górna granica wybuchowości

Akronim	Termin anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
GLP	Good Laboratory Practice	Dobra Praktyka Laboratoryjna
GMP	Good Manufacturing Practice	Dobra Praktyka Wytwarzania
GOx	Glucose oxidase	Oksydaza glukozowa
HAU	Hemagglutinating Unit	Jednostka hemaglutynacji
hBN	hexagonal boron nitride	Heksagonalny azotek boru
HD	Hexokinase	Heksokinaza
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2	Antygen nowotworowy
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ludzki wirus niedoboru odporności
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
hTERT	Human TElomerase Reverse Transcriptase	Gen odwrotnej transkryptazy ludzkiej telomerazy
HTS	High Throughput Screening	Wysokosprawne badania przesiewowe
ISE	Ion-Selective Electrode	Elektroda jonoselektywna
ISFET	Ion-Selective Field Effect Transistor	Jonoselektywny tranzystor polowy
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
K-ISE	Potassium-selective electrode	Elektroda jonoselektywna czuła na jony potasu
LDL	Lower Detection Limit	Granica wykrywalności
LED	Light-Emitting Diode	Dioda emitująca światło
LFA	Lateral Flow Assay	Test metodą przepływu bocznego
LIF	Laser Induced Fluorescence	Fluorescencja wzbudzana laserowo
LOC	Lab on a chip	Laboratorium na chipie
LOV	Lab-on-valve	Laboratorium w zaworze
Lp(a)	Lipoprotein a	Lipoproteina a
LSPR	Localized Surface Plasmon Resonance	Zlokalizowany powierzchniowy rezonans plazmonowy
LSV	Linear Sweep Voltammetry	Woltamperometria liniowa
mAb	Monoclonal antibody	Przeciwciało monoklonalne

Akronim	Termin anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
MCFIA	Multicommutated Flow Injection Analysis	Wielotorowa wstrzykowa analiza przepływowa
MEDOX	Oxidated mediator	Mediator utleniony
MEDRED	Reduced mediator	Mediator zredukowany
MEF	Metal-Enhanced Fluorescence	Fluorescencja wzmocniona metalem
MeOX	Oxidised form of mediator	Mediator w formie utlenionej
MeRED	Reduced form of mediator	Mediator w formie zredukowanej
MEMFET	Membrane Field Effect Transistor	Tranzystor polowy z membraną
MEMS	Micro Electro-Mechanical Systems	Mikroukłady elektromechaniczny
MIP	Molecularly Imprinted Polymer	Polimer znakowany molekularnie
MOF	Microstructured Optical Fiber	Światłowód mikrostrukturyzowany
MOS	Metal Oxide Semiconductor	Półprzewodnik typu metal-tlenek
MPBA	4-Mercaptophenylboronic acid	Kwas 4-merkaptofenyloboronowy
MPFS	Multipumping Flow Systems	Przepływowe systemy wielopompowe
MSFIA	Multisyringe Flow Injection Analysis	Wielostrzykawkowa wstrzykowa analiza
MUC	MUC protein	Mucyna, glikoproteina
MWCNTs	Multi-Walled Carbon Nanotubes	Wielościenne nanorurki węglowe
NAD+	Oxidised form of nicotinamide adenine dinucleotide	Forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADH	Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide	Forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
Nbs	Nanoantibody	Nanoprzeciwciała
NDIR	Nondispersive Infrared	Niedyspersyjna absorpcja podczerwieni
NHS	N-Hydroxysuccinimide	N-hydroksysukcynimid
NMP22	Nuclear Matrix Protein 22 (marker of bladder cancer)	Białko matrycowe jądra komórkowego (marker nowotworu pęcherza moczowego)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
NT-proBNP	N-terminal pro–B-type natriuretic peptide	N-końcowy propeptyd natriuretyczny typu B

Akronim	Termin anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
pAb	Polyclonal antibody	Przeciwciało poliklonalne
µPAD	Microfluidic paper-based analytical device	Mikroprzepływowy analizator o podłożu papierowym
PAN	1- (2-pyridylazo) -2-naphthol	1-(2-pirydylazo)-2-naftol
PARC	Pattern Recognition (System)	Blok rozpoznawania obrazu
PC	Plasmonic Coupling	Sprzężenie plazmoniczne
PCA	Principal Components Analysis	Analiza Głównych Składowych
PCF	Photonic Crystal fiber	Światłowód fotoniczny
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reakcja łańcuchowa polimerazy
PCW	Poly(Vinyl Chloride)	Poli(chlorek winylu)
PdNPs	palladium nanoparticles	nanocząstki palladu
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor	Płaskonabłonkowy czynnik wzrostu
PEDOT	Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)	Poli(3,4-etylenodioksytiofen)
PID	PhotoIonization Detector	Detektor fotojonizacyjny
PLS	Partial Least Squares	Metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów
PMA	Premarket Approval	Zatwierdzenie przed wprowadzeniem na rynek
PMMA	Poly(methyl methacrylate)	Poli(metakrylan metylu)
POC	Point-of-Care diagnosis	Diagnostyka w miejscu opieki nad pacjentem (diagnostyka spersonalizowana)
POCT	Point-of-Care treatment	Przyłóżkowe testy laboratoryjne
poliHEMA	Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate)	Poli(metakrylan 2-hydroksyetylu)
POT	poly(3-Octylthiophene)	Poli(3-oktylotiofen)
PPy	Polypyrrole	Polipirol
PR	Progesterone	Progesteron
PSA	Prostate Specific Antigen	Swoisty antygen gruczołu krokowego
PTFE	Poly(tetrafluroethene)	Poli(tetrafluoroetylen)
PtNPs	Platinum nanoparticles	nanocząstki platyny
PVC	Poly(Vinyl Chloride)	Poli(chlorek winylu)
PVF	PolyVinyl Ferrocene	Poli(winyloferrocen)

Akronim	Termin anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
PVP	PolyVinylPyrrolidone	Poli(4-winylopirolidon)
QC/QA	Quality Control /Quality Assurance	Kontrola jakości / Zapewnienie jakości
QCM	Quartz Crystal Microbalance	Mikrowaga kwarcowa
QMB	Quartz Crystal Microbalance	Sensor z kwarcową mikrowagą
Rct	Charge Transfer Resistance	Opór przeniesienia ładunku
REase	Restriction endonuclease	Restrykcyjna endonukleaza
rGO	reduced Graphene Oxide	Zredukowany tlenek grafenu
RNA	Ribonucleic Acid	Kwas rybonukleinowy
RT PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
SAM	Self-Assembled Monolayers	Samoorganizujące się monowarstwy
SAW	Surface Acoustic Wave	Powierzchniowa fala akustyczna
SEIRA	Surface-Enhanced IR Absoprtion	Powierzchniowo wzmocniona absorpcja w podczerwieni
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment	Systematyczna ewolucja ligandów poprzez wykładnicze wzbogacanie
SEM	Electromotive Force	Siła elektromotoryczna
SERS	Surface-Enhanced Raman Spectroscopy	Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana
SFA	Segmented Flow Analysis	Analiza z fragmentacją przepływu
SIA	Sequential Injection Analysis	Wstrzykowa analiza sekwencyjna
SMCC	Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate	Sukcynoimidylo-4-(N-maleimidometylo)cykloheksan
SPR	Surface Plasmon Resonanse	Technika rezonansu plazmonów powierzchniowych
SPRI	Surface Plasmon Resonance Imaging	Obrazowy rezonans plazmonów powierzchniowych
SSM	Separate Solution Method	Metoda roztworów rozdzielonych
SWCNTs	Single-Walled Carbon Nanotubes	Jednościenne nanorurki węglowe
T	Thymine	Tymina

Akronim	Termin anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
TAS	Total Analysis System	Kompletny system analityczny
TCNQ	Tetracyanochinodimetane	Tetracyjanochinonodimetan
TTF	Tetrathiafulvalene	Tetratiafulwalen
µTAS	Micro Total Analysis System	Miniaturowy kompletny system analityczny
UDI	Unique Device Identifier	System unikalnej identyfikacji wyrobów medycznych
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego
VOCs	Volatile Organic Compounds	Lotne związki organiczne

Słownik terminów

Adsorpcja – proces wiązania się atomów, jonów lub innych cząsteczek z fazy ciekłej, stałej lub gazowej z fizyczną powierzchnią

Amperometria – technika polegająca na przyłożeniu potencjału o stałej wartości do elektrody pracującej względem elektrody odniesienia, której odpowiedzią jest sygnał prądowy

Analit (ang. *analyte*) – substancja oznaczana.

Analiza Głównych Składowych (ang. *Principal Components Analysis, PCA*) – technika eksploracji danych umożliwiająca wnioskowanie o obiektach opisanych wieloma zmiennymi, bardzo popularna w analizie danych z elektronicznego nosa/języka. Podstawą PCA jest analiza rozkładu zmienności danych pochodzących z wielu pomiarów, a następnie znalezienie nowych, ortogonalnych względem siebie kierunków w wielowymiarowej przestrzeni, które w maksymalny sposób pozwolą na ukazanie tej zmienności. PCA umożliwia uporządkowanie informacji tak, że w pierwszych wymiarach znajduje się największa ilość informacji znaczącej.

Analiza przepływowa (ang. f*low analysis*) – tryb prowadzenia analizy chemicznej, wykorzystujący ciągłe lub dyskretne wprowadzanie próbki badanej do segmentowanego lub niesegmentowanego strumienia nośnika. W czasie przepływu realizowane mogą być także dodatkowe operacje, takie jak oczyszczanie, zatężanie analitu, czy mieszanie z reagentami w celu uzyskania łatwiej oznaczalnego produktu reakcji.

Analiza przepływowa bezpośredniego wstrzyknięcia (ang. *Batch-flow Injection Analysis, BFIA*) – sposób prowadzenia procesu analizy chemicznej, w którym dozowanie odbywa się z użyciem zaworów elektromagnetycznych, a odpowiednie reagenty są transportowane w kierunku detektora z wykorzystaniem pomp perystaltycznych, przy czym sama reakcja analityczna nie zachodzi w przepływie. Poszczególne reagenty są umieszczane w specjalnej komorze mieszania, często wyposażonej w mieszadło magnetyczne, a wytworzony produkt reakcji jest następnie transportowany do detektora lub mierzony bezpośrednio w komorze mieszania z użyciem zintegrowanego z tym modułem systemu do detekcji.

Analiza z użyciem ciągłego przepływu (ang. *Continuous Flow Analysis, CFA*) – sposób prowadzenia procesu analizy chemicznej, w którym próbkę wstrzykuje się do roztworu nośnika, płynącego z dużą szybkością przez przewód o małej średnicy.

Analiza z fragmentacją przepływu (ang. *Segmented Flow Analysis, SFA*) – sposób prowadzenia procesu analizy chemicznej, w którym próbkę wstrzykuje się do roztworu nośnika, płynącego z dużą szybkością przez przewód o małej średnicy, przy czym pomiędzy segmentami próbki oraz segmentami nośnika wprowadza się pęcherzyki gazu (powietrza lub azotu) w celu ograniczenia dyspersji próbki w nośniku.

Antygen (ang. *antigen*) – substancja, która wprowadzona do organizmu wywołuje u niego reakcję immunologiczną polegającą na proliferacji limfocytów i wytworzeniu się swoistych przeciwciał.

Aptamer – krótka sekwencja oligonukleotydowa DNA lub RNA, która na skutek oddziaływania z analitem zmienia swoją konformację przestrzenną.

Biochemiczne zapotrzebowanie tlenu (BZT) – jeden ze wskaźników czystości wody. określa ilość tlenu wymaganą do utlenienia związków organicznych rozpuszczonych w próbce wody przez mikroorganizmy (bakterie aerobowe).

Biokatalizator – substancja występująca naturalnie w organizmie żywym (np. enzym), regulująca przebieg zachodzących w nim procesów biochemicznych.

Biomarker (ang. *biomarker*) – wskaźnik biologiczny w postaci substancji, właściwości fizjologicznej czy też genu, wskazujący na obecność stanu

chorobowego.

Bionika – nauka interdyscyplinarna na pograniczu techniki i biologii, zajmująca się badaniem, modelowaniem oraz symulacją funkcjonowania układów biologicznych.

Bioreceptor *(ang. bioreceptor)* **–** cząsteczka będąca elementem biologicznym (np. enzym, sonda DNA, przeciwciało), która jest zdolna do selektywnego oddziaływania z rozpoznawanym analitem (np. substratem enzymu, komplementarną sekwencją DNA, antygenem itp.).

Biosensor lub bioczujnik (*ang. biosensor)* – zminiaturyzowane urządzenie analityczne, które zawiera biologicznie aktywny materiał w bezpośrednim kontakcie z właściwie dobranym elementem przetwornikowym, w celu detekcji stężenia lub aktywności substancji chemicznej w próbce.

Biosensor katalityczny – biosensor, którego działanie polega na uczestnictwie warstwy receptorowej w reakcji chemicznej, której efektem jest powstanie produktu lub ubytek substratu, który powoduje zmianę mierzonego w układzie sygnału.

Biosensor powinowactwa – biosensor, którego działanie polega na selektywnym wiązaniu warstwy receptorowej z analitem, którego efektem jest powstanie stabilnych kompleksów warstwa receptorowa – analit.

Biosensory mikrobiologiczne (*ang. microbial biosensors*) – urządzenie analityczne, w którym na przetworniku unieruchomione są mikroorganizmy, w celu wykrycia docelowych analitów.

Biozgodność lub **Biokompatybilność** (ang. *biocompatibility*) – cecha charakteryzująca materiały lub substancje warunkująca prawidłowe działanie i trwałość w układzie biologicznym.

Blok rozpoznawania obrazu *(ang. Pattern Recognition System, PARC)* – zespół procedur numerycznych służących przetwarzaniu wstępnemu i rozpoznawaniu „profilu" próbki badanej za pomocą elektronicznego nosa lub elektronicznego języka.

Chemicznie modyfikowany tranzystor polowy (ang. *Chemically Modified Field Effect Transistor,* CHEMFET**) –** elektrochemiczny sensor na stałym podłożu

krzemowym, w którym jonoczuła membrana polimerowa nakładana jest na powierzchnię tranzystora polowego ISFET. Potencjał takich sensorów jest funkcją aktywności jonów w roztworze, na które jest czuła membrana polimerowa.

Chemisorpcja – rodzaj procesu adsorpcji, który polega na wiązaniu się adsorbentu z powierzchnią na skutek reakcji chemicznej.

Chronopotencjometria (ang. *chronopotentiometry*) – technika elektrochemiczna polegająca na rejestracji zależności potencjału elektrody pracującej od czasu w warunkach galwanostatycznych.

Czas odpowiedzi sensora (ang. *response time*) – czas, po którym wyjściowy sygnał sensora osiąga 63% (t_{63}) lub 95% (t_{95}) jego wartości po nieskończenie długim czasie ustalania się równowagi, w odpowiedzi na skokową zmianę stężenia analitu.

Czas życia, stabilność długoterminowa sensora (ang. *lifetime, long-term stability*) – czas poprawnego działania sensora, z zaznaczeniem trybu stosowania.

Czułość sensora (ang. *sensitivity*) – nachylenie liniowego odcinka krzywej odpowiedzi sensora, wyrażone jako wartość sygnału na jednostkę stężenia lub aktywności analitu.

Czułość – parametr charakteryzujący sensor chemiczny lub metodę analityczną, opisujący zmianę sygnału w funkcji zmiany stężenia (aktywności), t.j. współczynnik kierunkowy krzywej kalibracji (wzorcowej).

Detektor – urządzenie, które stwierdza obecność substancji chemicznych powyżej określonej wartości progowej.

Diagnostyka medyczna lub analityka medyczna – dyscyplina medycyny, której zadaniem jest określanie składu oraz parametrów biologicznych i fizykochemicznych materiałów pobranych od pacjenta.

Dolna granica wybuchowości (ang. *lower flammability limit*) – najniższe stężenie substancji palnej, która w mieszaninie z powietrzem może wybuchać od bodźca termicznego.

Elektroda Clarka – amperometryczne urządzenie przeznaczone do oznaczania stężenia tlenu w próbkach ciekłych. Zbudowana jest z pracującej elektrody

platynowej oraz chlorosrebrowej elektrody odniesienia, zanurzonych w roztworze elektrolitu oddzielonego od próbki membraną przepuszczalną dla gazów.

Elektroda jonoselektywna (ang. *Ion-Selective Electrode, ISE*) – elektroda, której potencjał zależy od aktywności określonego jonu w roztworze.

Elektroda odniesienia (porównawcza, referencyjna) – elektroda zachowująca stały potencjał w trakcie pomiaru, służąca jako element ogniwa stosowanego w technikach elektroanalitycznych, służąca do śledzenia zmian potencjału elektrody wskaźnikowej (w potencjometrii) lub ustalania potencjału elektrody pracującej (w technikach prądowych np. woltamperometrii).

Elektroda Severinghausa – elektroda przeznaczona do oznaczania dwutlenku węgla. Zbudowana jest z elektrody szklanej (pH-czułej), zanurzonej w roztworze elektrolitu oddzielonego od próbki membraną przepuszczalną dla gazów.

Elektrokataliza – rodzaj katalizy, której efektem jest zmiana szybkości reakcji odbywającej się na powierzchni elektrody.

Elektroniczny nos i elektroniczny język – systemy, których budowa i zasada działania zostały zainspirowane naturalnymi zmysłami węchu i smaku (w literaturze naukowej nazywane także: sztuczny nos, mechaniczny nos, sensor zapachu, sztuczny język, sensor smaku). Służą do automatycznej analizy i rozróżniania próbek o złożonym składzie, do rozpoznawania ich charakterystycznych właściwości i najczęściej przeznaczone są do szybkiej analizy jakościowej. Składają się z matrycy częściowo selektywnych czujników chemicznych i zespołu metod numerycznych (bloku rozpoznawania obrazu), służących do analizy jej sygnałów.

Elektroprzędzenie (ang. *electrospinning*) – metoda otrzymywania nanowłókien z roztworów, zawiesin lub stopów, z wykorzystaniem pola elektrycznego o dużym natężeniu, zasadniczymi elementami układu są igła iniekcyjna jako dysza przędząca i kolektor, igła znajduje się pod wysokim napięciem w stosunku do kolektora.

Enkapsulacja – proces stabilizacji cząsteczek przy zachowaniu ich właściwości chemicznych, fizycznych oraz biologicznych poprzez powstanie cienkiej otoczki wokół cząsteczek stałych, kropelek cieczy lub cząstek gazowych.

Enzym – cząsteczka (najczęściej proste lub złożone białko) warunkująca zachodzenie ważnych reakcji i procesów biochemicznych.

Fala zanikająca – pole elektromagnetyczne powstające na granicy dwóch ośrodków różniących się gęstością optyczną.

Fotojonizacja (ang. *photoionization*) – proces jonizacji (rozpadzie na naładowane cząstki) obojętnych cząsteczek związków chemicznych. W przypadku fotojonizacji proces ten zachodzi pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego o odpowiednio dobranej energii fotonów.

Funkcjonalne kwasy nukleinowe – cząsteczki kwasów nukleinowych, które wykazują właściwości katalityczne i/lub receptorowe.

Genom – kompleksowa informacja genetyczna dla określonego organizmu

Górna granica wybuchowości (ang. *upper flammability limit*) – najwyższe stężenie substancji palnej, która w mieszaninie z powietrzem może wybuchać od bodźca termicznego.

Granica wykrywalności, granica detekcji sensora (ang. *detection limit*) – najmniejsze stężenie analitu, które może być wykryte za pomocą sensora.

Immobilizacja (ang. *immobilization*) – stabilne i zapewniające aktywność układu unieruchomienie cząsteczek, warstwy receptorowej na powierzchni przetwornika wykorzystujące oddziaływania fizyczne lub chemiczne.

Immobilizacja enzymu – sposób unieruchomienia (kotwiczenia) enzymu na nośniku (przetworniku): **enkapsulacja (kapsułkowanie)** – unieruchomienie enzymu polegające na zamknięciu go w sferycznej kapsule utworzonej z półprzepuszczalnej membrany.

Pułapkowanie– unieruchomienie enzymu wewnątrz struktur naturalnych lub syntetycznych; **sieciowanie –** unieruchomienie enzymu na nośniku w wyniku oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy enzymem a nośnikiem.

Immunosensor (ang. *Immunosensor*) – czujnik posiadający przeciwciała jako element biologiczny, w którym reakcja immunochemiczna jest sprzężona z odpowiednimi przetwornikami. Podstawową działania immunosensora jest proces rozpoznania molekularnego między antygenem i przeciwciałem.

Interferometria biowarstwowa – to optyczna technika pomiaru oddziaływań międzycząsteczkowych, w której mierzy się interferencję światła odbitego od warstwy receptorowej oraz warstwy referencyjnej, znajdujących się na końcu włókna optycznego Na powierzchni warstwy receptorowej są immobilizowane receptory (np. przeciwciała) wiążące cząsteczki analitu. W wyniku wiązania uzyskuje się przesunięcie długości fali w widmie interferencyjnym.

Jonoczuły tranzystor polowy (ang. *Ion-Sensitive Field Effect Transistor, ISFET*) **–** elektrochemiczny sensor na podłożu krzemowym, którego potencjał zależy od aktywności jonów H^+ w roztworze; wykorzystuje klasyczny tranzystor polowy (FET), w którym usunięto metaliczną bramkę i zastąpiono roztworem próbki, kontaktującym się z elektrodą referencyjną.

Jonofor (ang. *ionophore*) – obojętny lub obdarzony ładunkiem lipofilowy związek, zdolny do selektywnego i odwracalnego wiązania jonów, odpowiedzialny za selektywność membrany.

Kompletny system analityczny (ang. *Total Analysis System, TAS*) – system pomiarowy do prowadzenia procesu analizy chemicznej, który w sposób automatyczny realizuje w całości daną analizę chemiczną. Operacje wykonywane przez system obejmują wszystkie niezbędne etapy analizy – począwszy od pobrania reprezentatywnej próbki, poprzez jej transport i wstępną obróbkę (roztwarzanie, rozcieńczanie, zatężanie, filtracja, ekstrakcja etc.), aż po ewentualne przeprowadzenie niezbędnych reakcji i detekcję produktu.

Koniugat (nanomateriału) (ang. *conjugate*) – powierzchniowo funkcjonalizowany nanomateriał z przyłączonymi cząsteczkami nadającymi nanostrukturze określone właściwości.

Laboratorium w zaworze (ang. *Lab-on-valve, LOV*) – system pomiarowy do prowadzenia procesu analizy chemicznej, w którym wykorzystano integrację kluczowych elementów układu, odpowiadających za dokonywane na próbce operacje (np. mieszanie, ekstrakcja, przeprowadzanie reakcji w trybie zatrzymania przepływu) w module połączonym bezpośrednio z portem wstrzykowym zaworu wielokanałowego.

Matryca polimerowa – polimerowy materiał membrany jonoselektywnej (najczęściej z dodatkiem plastyfikatora), odpowiedzialny za jej właściwości

mechaniczne.

Membrana jonoselektywna – matryca polimerowa i rozpuszczone w niej składniki elektroaktywne, część sensora odpowiedzialną za selektywne rozpoznanie jonu.

Metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów (ang. *Partial Least Squares, PLS*) – metoda modelowania bardzo często stosowana w chemometrii, zwłaszcza wtedy, kiedy bardzo wiele zmiennych opisuje każdy obiekt, tak jak w przypadku elektronicznego nosa/języka. PLS służy do znalezienia relacji między dwiema macierzami – macierzą danych X i macierzą celu Y, opisując ją za pomocą tzw. zmiennych ukrytych (ang. *Latent Variables*), objaśniających w możliwie maksymalny sposób kowariancję pomiędzy tymi zbiorami danych.

Mikrofluidyka – nauka badająca zachowanie płynów w mikrokanałach oraz technologia wytwarzania urządzeń zawierających miniaturowe kanały i inne komponenty do manipulacji płynami.

Mikromacierze DNA – miniaturowy układ hybrydyzacyjny umożliwiający wykrycie określonych fragmentów DNA lub RNA, który tworzony jest przez fragmenty DNA/RNA unieruchomione na powierzchni matrycy.

Mikroorganizmy (drobnoustroje) – ogół organizmów jednokomórkowych, obejmująca bakterie, archeony, pierwotniaki i grzyby mikroskopijne.

Miniaturowy kompletny system analityczny (ang. *Micro Total Analysis System, μTAS*) – określane także jako laboratorium na chipie (ang. *Lab-on-a-chip, LOC*) to zminiaturyzowany system pomiarowy do prowadzenia procesu analizy chemicznej, który w sposób automatyczny realizuje w całości daną analizę chemiczną. Operacje wykonywane przez mikrosystem obejmują wszystkie niezbędne etapy analizy – począwszy od pobrania reprezentatywnej próbki, poprzez jej transport i wstępną obróbkę (roztwarzanie, rozcieńczanie, zatężanie, filtracja, ekstrakcja etc.), aż po ewentualne przeprowadzenie niezbędnych reakcji i detekcję produktu. – system pomiarowy do prowadzenia procesu analizy chemicznej.

Monowarstwy samoorganizujące się – układy molekularne, które w drodze samoorganizacji powstają spontanicznie na odpowiednio dobranym podłożu.

MXeny – grupa ok. 20 hydrofilowych związków, tworzących dwuwymiarowe nanostruktury podobne do grafenu i wykazujących pożądane właściwości fizykochemiczne. Należą do nich węgliki, azotki albo węglikoazotki metali przejściowych o wzorze ogólnym Mn+1Xn (M –atomy metali przejściowych, X – atomy węgla i azotu).

Nanomateriały (ang. *nanomaterials*) – nierozpuszczalne lub biotrwałe i celowo wytworzone materiały posiadające co najmniej jeden wymiar zewnętrzny lub strukturę wewnętrzną poniżej 100 nm.

Nanosensory / mikrosensory (ang. *nanosensors / microsensors*) – sensory w postaci cząstek o rozmiarach rzędu nanometrów / mikrometrów.

Nanowłókna (ang. *nanofibres*) – włókna o średnicy rzędu nanometrów, otrzymywane zwykle metodą elektroprzędzenia.

Nowotwór (ang. *tumor or cancer*) – nieprawidłowa tkanka, powstająca na skutek niekontrolowanego namnażania się komórek nowotworowych.

Parametr pracy sensora– cecha charakteryzująca działanie danego sensora taka jak selektywność, dolna granica detekcji, czułość, stabilność.

Pelistor (ang. *pellistor*) – jeden z dwóch elementów gazowego czujnika katalitycznego, pokryty warstwą katalityczną (najczęściej warstwą metalu szlachetnego).

Plazmony powierzchniowe – powierzchniowe fale elektromagnetyczne, które rozchodzą się równolegle do obszaru wzajemnych oddziaływań metal-dielektryk.

Potencjometria – technika elektroanalityczna (zespół metod) polegająca na pomiarze siły elektromotorycznej ogniwa składającego się z elektrody wskaźnikowej i porównawczej (odniesienia, referencyjnej).

Prąd pojemnościowy – prąd generowany na skutek ładowania się warstwy dielektrycznej pomiędzy elektrodą i roztworem.

Proces SELEX – proces identyfikacji sekwencji aptamerów DNA lub RNA, składający się z powtarzających cykli wiązania, separowania oraz namnażania określonej puli sekwencji DNA lub RNA.

Przeciwciała lub immunoglobuliny (ang. *antibody*) – białka wydzielane przez komórki plazmatyczne (pobudzone limfocyty B) w odpowiedzi immunologicznej, mające zdolność do swoistego rozpoznawania antygenów.

Przepływowy system wielopompowy (ang. *Multipumping Flow System, MPFS*) – system pomiarowy do prowadzenia procesu analizy chemicznej, w którym przepływ generowany jest z użyciem mikropomp, czyli urządzeń mających możliwość precyzyjnego dozowania niewielkich objętości medium (3–50 µl) w porcjach wprowadzanych do układu z zadaną częstotliwością. Przewody z płynami pompowanymi przez poszczególne mikropompy mogą być skonfigurowane analogicznie jak w systemach wielotorowej analizy przepływowej i sterowane za pomocą zaworów elektromagnetycznych umieszczanych w poszczególnych punktach węzłowych. Dodatkowym elementem podlegającym sterowaniu są tutaj także same mikropompy, w przypadku których można na bieżąco modyfikować szybkość przepływu.

Przetwornik (ang. *Transducer*) – urządzenie przekształcające daną wielkość na inną wielkość według określonej zależności i z pewną dokładnością. W przypadku sensorów jest to urządzenie przekształcające informację chemiczną lub proces biologiczny na mierzalny sygnał analityczny.

Receptor *(ang. Receptor*) **–** związek chemiczny, ligand zdolny do selektywnego rozpoznawania (oddziaływania, wiązania, kompleksowania) analitu.

Redukcja – proces chemiczny, w wyniki którego dochodzi do przyłączenia elektronu przez atomy lub jony.

Rozpoznawanie molekularne – selektywne oddziaływanie analitu (gościa) z cząsteczką receptora (liganda, gospodarza), z wykorzystaniem wiązań niekowalencyjnych.

Roztwór koloidalny (ang. *colloidal colution*) – heterogeniczny układ dyspersyjny, w którym można wyróżnić fazę ciągłą rozpraszającą (rozpuszczalnik) i nieciągłą fazę rozproszoną o przeciętnej średnicy cząsteczek w zakresie 1 – 100 nm.

Ryboprzełącznik – to fragment sekwencji RNA matrycowego, które jest odpowiedzialny za regulowanie ekspresji kodowanego przez siebie białka na skutek zmiany poziomu określonego metabolitu.

Rybozym – sekwencja kwasu RNA, która wykazuje właściwości katalityczne

Selektywność (ang. *selectivity*) **–** zdolność sensora chemicznego do określenia stężenia (aktywności) analitu w próbce w obecności związków przeszkadzających (interferentów), najczęściej wyrażana współczynnikami selektywności.

Sensor lub czujnik – zminiaturyzowane urządzenie analityczne, które dostarcza informację o stężeniu lub aktywności składnika złożonej próbki w czasie rzeczywistym, w trybie on-line.

Siła elektromotoryczna – różnica potencjałów między elektrodami w ogniwie w warunkach bezprądowych.

Składniki elektroaktywne – (jonofor, lipofilowe dodatki jonowe) związki nadające membranie selektywność na wybrane jony.

Struktura anizotropowa (ang. *anisotropic structure*) – struktura, której właściwości zależą od wybranego kierunku przestrzennego, w którym dana właściwość jest rozpatrywana.

Sztuczny enzym/nanozym (ang. *artificial enzyme/nanozyme*) – materiał (lub nanomatriał) wykazujący aktywność katalityczną typową dla natywnego enzymu. Najczęściej nanozymy naśladują aktywności katalazy, oksydazy i peroksydazy.

Test aglutynacji (ang. *sgglutination test*) – metoda wykrywania antygenów w płynach ustrojowych opierająca się na wykorzystaniu mikrocząstek (typowo lateksu) opłaszczonych specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi. Tak opłaszczone cząsteczki inkubuje się z pobranym płynem ustrojowym. Obecność wykrywanej substancji przejawia się zlepianiem cząstek zawieszonych w roztworze z wytworzeniem łatwo widocznej zawiesiny.

Test immunochromatograficzny (ang. *Immunochromatographic/Lateral Flow Assay, LFA*) – test realizowany na podłożu porowatym (papier, membrana) do wykrywania i oznaczania ilościowego analitów w złożonych mieszaninach. Charakteryzuje go prostota odczytu (najczęściej wizualnego) a wyniki są uzyskiwane w ciągu 5–30 min. Zazwyczaj testy te są używane w diagnostyce medycznej do testów domowych, testów w punkcie opieki lub do użytku laboratoryjnego. Najczęściej w roli receptorów testów immunochromatograficznych wykorzystywane są przeciwciała.

Transkrypcja – proces syntezy kwasu RNA powstający na skutek przepisania informacji zapisanej w kwasie DNA

Ubieralny sensor (ang. *wearable sensor*) – sensor zintegrowany z elementem ubioru lub bezpośrednio z ciałem, celem monitorowania stanu zdrowia i/lub dostarczenia klinicznie istotnych danych. Ubieralne sensory bądź platformy sensorów typowo wykorzystują w swojej konstrukcji rozciągliwą i elastyczną elektronikę.

Utlenienie – proces chemiczny, w wyniki którego dochodzi do utraty elektrony przez atomy lub jony.

Warstwa chemoczuła (ang. *chemosensitive layer*) – część receptorowa czujnika, bezpośrednio oddziałująca z badaną próbką, wykazująca względnie wysoką selektywność wobec danego indywiduum chemicznego.

Warstwa przejściowa – jest to element sensora wprowadzany pomiędzy membranę jonoselektywną a elektrodę wewnętrzną, odpowiedzialny za termodynamiczne zdefiniowanie granic faz.

Warstwa receptorowa (ang. *receptor layer*) – najważniejszy element czujnika, odpowiadający za specyficzne rozpoznanie analitu. W biosensorach tworzą ją elementy biologiczne takie jak: enzymy, nici DNA, przeciwciała, białka, porfiryny czy organelle komórkowe.

Wektor celu – wektor z zakodowaną w postaci numerycznej przynależnością do określonej klasy obiektów, informacją o właściwościach próbki, lub o zawartości kluczowego składnika/składników. Wektory celu dla wielu próbek badanych tworzą macierz celu Y.

Wektor obrazu – wektor n cech określających badaną próbkę, inaczej wzór odpowiedzi; najczęściej wartości sygnałów n kolejnych czujników tworzących macierz czujnikową elektronicznego języka lub nosa. Wzory odpowiedzi uzyskane podczas pomiarów wielu próbek tworzą macierz danych X.

Wielostrzykawkowa wstrzykowa analiza przepływowa (ang. *Multisyringe Flow Injection Analysis, MSFIA*) – sposób prowadzenia procesu analizy chemicznej, w którym przepływ generowany jest z użyciem zespołu strzykawek, poruszanych równocześnie za pomocą tego samego silnika krokowego. Każda ze

strzykawek jest połączona z zaworem elektromagnetycznym, kierującym przepływ w określonym kierunku – albo w stronę detektora, albo z powrotem do zbiornika z danym roztworem. Mieszanie badanej próbki, nośnika i reagentów w odpowiednich stosunkach objętościowych uzyskuje się poprzez stosowanie strzykawek o odpowiednio dobranych średnicach wewnętrznych.

Wielotorowa wstrzykowa analiza przepływowa (ang. *Multicommutated Flow Injection Analysis, MCFIA*) – sposób prowadzenia procesu analizy chemicznej, w którym stosowane są przełączniki sterowane komputerowo (tzw. komutatory), np. zawory elektromagnetyczne, decydujące o kierunku przepływu strumieni próbki, nośnika i poszczególnych reagentów.

Woltamperometria – technika, w której do elektrody pracującej przykładany jest potencjał o określonym zakresie względem elektrody odniesienia. W tej technice stosowany jest układ trójelektrodowy.

Wstrzykowa analiza przepływowa (ang. *Flow Injection Analysis, FIA*) – sposób prowadzenia procesu analizy chemicznej, w którym próbkę wstrzykuje się do roztworu nośnika, płynącego z dużą szybkością przez przewód o małej średnicy, który następnie łączony jest ze strumieniami reagentów.

Wstrzykowa analiza sekwencyjna (ang. *Sequential Injection Analysis, SIA*) – sposób prowadzenia procesu analizy chemicznej, w którym stosowane są wieloportowe zawory wstrzykowe. Przepływ w układzie jest generowany przez pompę połączoną z zaworem, co pozwala na regulację składu płynu przepływającego przez układ poprzez otwieranie bądź zamykanie odpowiednich portów w zaworze. Dzięki temu możliwe jest precyzyjne sterowanie dozowaniem roztworów nośnika, próbki i reagentów.

Zakres dynamiczny odpowiedzi sensora (ang. *dynamic range*) – zakres stężeń lub aktywności analitu, w których czułość sensora jest większa od zera.

Znacznik (ang. *label*) – związek chemiczny dowiązywany do cząsteczki analitu lub wprowadzany bezpośrednio do roztworu próbki, w celu detekcji oddziaływań zachodzących pomiędzy analitem a receptorem.

Znacznik redoks – związek lub cząsteczka wykazująca zdolność do utleniania bądź redukcji przy określonej wartości potencjału.

1

Wprowadzenie

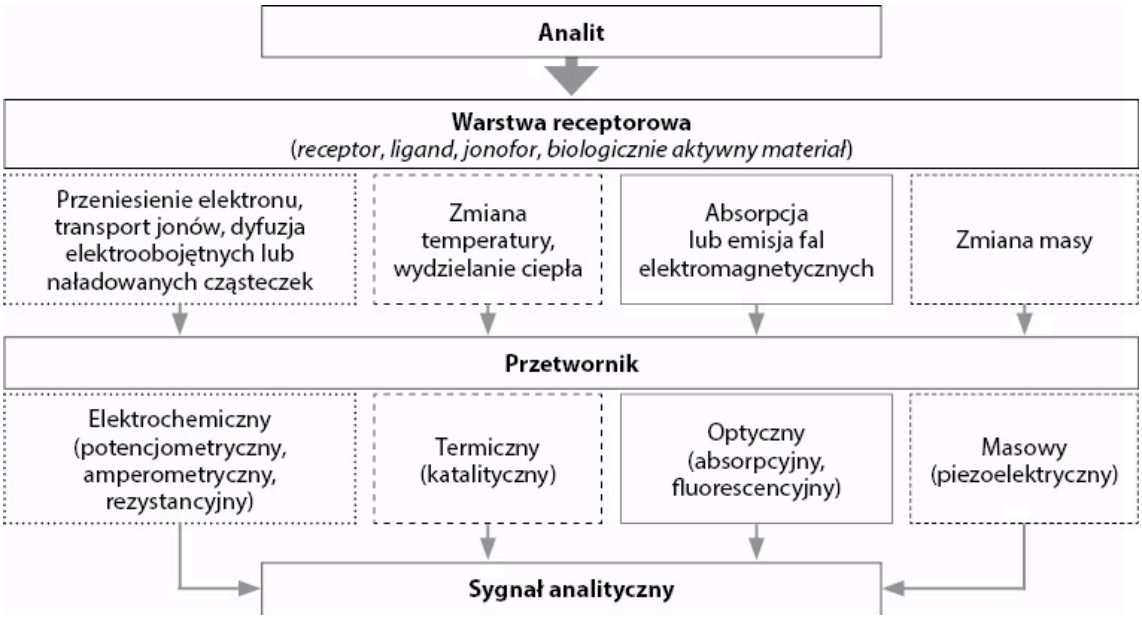
Elżbieta MALINOWSKA, Wojciech WRÓBLEWSKI

Postęp w dziedzinie nowoczesnych systemów metrologii chemicznej jest stymulowany przede wszystkim świadomością nowych zagrożeń w otoczeniu człowieka i rozszerzaniem spektrum potrzeb kontroli analitycznej. Wyniki analiz chemicznych, istotnych przy podejmowaniu decyzji dotyczących zdrowia, bezpieczeństwa i jakości życia, są dzisiaj otrzymywane najczęściej przy zastosowaniu technik chromatograficznych, spektroskopowych i elektrochemicznych. W przypadku szybkich i zautomatyzowanych pomiarów, w szczególności w trybie monitorowania, alternatywą mogą być **sensory chemiczne**, które często z powodzeniem zastępują drogie i skomplikowane instrumenty pomiarowe, stosowane rutynowo w analizie chemicznej. Zaletą sensorów chemicznych jest połączenie czułości i selektywności klasycznych technik analitycznych z wieloma niedrogimi rozwiązaniami konstrukcyjnymi dostosowanymi do określonego zastosowania.

Zgodnie z tzw. definicją Cambridge, sensor chemiczny jest zminiaturyzowanym urządzeniem analitycznym, które dostarcza informację o obecności (stężeniu) określonych składników złożonej próbki w czasie rzeczywistym, w trybie *on-line* [1]. Opis ten podkreśla najważniejszą cechę charakterystyczną sensorów chemicznych, jaką jest odmienna, w stosunku do tradycyjnych technik instrumentalnych, metodyka analityczna. Sensory chemiczne są umieszczane bezpośrednio w badanym ośrodku – tzw. analiza *in-situ*, co prowadzi do eliminacji konieczności pobierania i chemicznej modyfikacji próbki (ze względu jednak na różnorodność analizowanych układów i stosowanych w praktyce procedur, powyższe warunki nie zawsze są spełnione). W tym miejscu należy dodać, że w języku polskim funkcjonuje także termin **czujnik chemiczny**, który może być stosowany zamiennie z pojęciem **sensor chemiczny** (choć w niektórych opracowaniach czujnikami mogą być określone urządzenia mierzące wielkości fizyczne). Sensor lub czujnik nie powinien być natomiast utożsamiamy z **detektorem** – urządzeniem, które stwierdza obecność chemicznych substancji powyżej określonej wartości progowej, a mierzony sygnał jest związany z procesem fizycznym, nie zaś z obecnością określonego związku chemicznego (np. szeroko wykorzystywany detektor przewodnictwa cieplnego w chromatografii gazowej).

Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) proponuje nieco inną definicję [2] – sensor chemiczny jest urządzeniem pozwalającym na przekształcenie informacji chemicznej na sygnał użyteczny analitycznie. Informacja chemiczna jest tutaj rozumiana jako stężenie określonego składnika próbki po jej ogólny skład, natomiast jej źródłem może być reakcja chemiczna

oznaczanego składnika lub fizyczna właściwość badanego obiektu. Ponadto, podstawowymi elementami sensora chemicznego są: chemicznie selektywna warstwa receptorowa (*receptor part*) oraz element przetwornikowy (*transducer part*). W części receptorowej, w wyniku oddziaływania między receptorem a analitem, następuje przekształcenie informacji chemicznej w pewną formę energii (np. zmiana: potencjału elektrochemicznego na granicy faz, intensywności promieniowania elektromagnetycznego, masy lub temperatury). Przetwornik jest natomiast urządzeniem zdolnym do konwersji energii niosącej chemiczną informację o próbce na końcowy sygnał analityczny (najczęściej elektryczny) i nie wykazuje selektywności chemicznej. Powyższe podejście jest użyteczne, ponieważ umożliwia prostą klasyfikację sensorów chemicznych (rys. 1.1), w zależności od rodzaju stosowanego przetwornika, na 4 podstawowe kategorie: elektrochemiczne, optyczne, termiczne oraz masowe (choć logiczny jest również podział np. na sensory przeznaczone do pomiarów próbek ciekłych oraz próbek gazowych – sensory gazowe).



RYS. 1.1

Budowa sensorów chemicznych zgodnie z IUPAC i zasada generowania sygnału analitycznego

Przedstawione powyżej przykładowe kategorie sensorów chemicznych nie wymieniają biosensorów, szczególnej grupy sensorów, które mogą wykorzystywać w swej konstrukcji przetworniki wszystkich czterech rodzajów. Biosensor jest bowiem urządzeniem analitycznym, które zawiera biologicznie aktywny materiał (enzymy, mikroorganizmy, organelle komórkowe, antygeny/przeciwciała, oligonukleotydy lub aptamery) w bezpośrednim kontakcie z właściwym elementem przetwornikowym, umożliwiającym oznaczanie substancji chemicznych w próbce. Według ogólnie przyjętej terminologii biosensorów, przedrostek „bio” odnosi się do natury reakcji biochemicznej pomiędzy biologiczną warstwą receptorową a analitem (rolą przetwornika jest natomiast przekształcenie efektów tych oddziaływań na sygnał wyjściowy). Pierwotnie biosensorem

określano urządzenie analityczne stosowane do oznaczania analitu o charakterze biologicznym lub analitu w próbkach biologicznych.

Omawiając problematykę sensorów chemicznych i biosensorów, należy również wspomnieć o nadużywaniu terminu „sensor" w piśmiennictwie naukowym. Jako sensor chemiczny jest dość często określany ligand zdolny do selektywnego rozpoznawania analitu (dotyczy to w szczególności prac poświęconych syntezie i badaniu właściwości receptorów molekularnych). Zgodnie z przytoczonymi wcześniej rozważaniami, takie nazewnictwo nie jest uzasadnione, ponieważ sensor chemiczny jest autonomicznym urządzeniem dostarczającym informację o składzie próbki (czego nie umożliwiają cząsteczki receptorów), a jego budowa, obok kluczowej warstwy zawierającej cząsteczki receptora, obejmuje także inne elementy [3].

Kluczem do opracowania sensora chemicznego lub biosensora jest poznanie mechanizmu rozpoznawania molekularnego analitu przez cząsteczkę receptora (liganda, gospodarza) i tworzenia produktu jego oddziaływania z cząsteczką analitu (gościa), poprzez tworzenie wiązań niekowalencyjnych, wśród których dominują: wiązania koordynacyjne, wodorowe, siły hydrofobowe, siły van der Waalsa, oddziaływania π-π, wiązanie halogenowe lub oddziaływania rezonansowe. Proces rozpoznawania molekularnego bazuje na komplementarności wielkości, kształtu oraz sił międzycząsteczkowych i może przebiegać na powierzchni warstwy receptorowej lub w jej objętości. Szeroka gama tych oddziaływań przyczynia się do zróżnicowania rozpoznawania molekularnego składników próbki o złożonej matrycy, a w praktyce umożliwia zaprojektowanie sensora o określonej selektywności [4].

W pionierskich pracach nad sensorami chemicznymi można zauważyć inspirację biologią. Znajomość właściwości chemicznych walinomycyny, naturalnego antybiotyku, pozwoliła na wykorzystanie jej jako receptora (tzw. jonofora) w elektrodach jonoselektywnych z membranami polimerowymi. Chemicy bardzo szybko wykazali, że można zaprojektować i otrzymać cząsteczki syntetycznych jonoforów. Obecnie dysponujemy ogromną biblioteką jonoforów selektywnych zarówno w stosunku do kationów, jak i anionów, zaprojektowanych zgodnie z zasadami komplementarności molekularnej.

Obserwowane w naturze specyficzne procesy rozpoznawania, które zachodzą między biocząsteczką i odpowiednią dla niej cząsteczką komplementarną, stały się źródłem wiedzy i podstawą funkcjonowania biosensorów. Głównym źródłem elementów warstw receptorowych biosensorów, stały się enzymy, przeciwciała, kwasy nukleinowe i inne receptory, które łączą się tylko z określonym obiektem, gwarantując wysoką selektywność, a w wielu przypadkach wręcz specyficzność sensora. Tu procesy rozpoznawania molekularnego zachodzą według różnych mechanizmów, w zależności od charakteru zastosowanego elementu biologicznego. Przykładowo, enzymy mogą być/są stosowane w naturalnej postaci (obecne w mikroorganizmach czy też w plastrach nienaruszonej tkanki) lub w formie wyizolowanej i oczyszczonej. Działają one jako biologiczne katalizatory określonych reakcji i są zdolne do wiązania się ze specyficznymi substratami. Taka reakcja katalityczna jest podstawą działania biosensorów enzymatycznych. Mierzony sygnał jest najczęściej funkcją ubytku substratu lub produktu reakcji katalitycznej, zachodzącej w warstwie receptorowej. Przeciwciała

działają według innego mechanizmu. Wiążą się one specyficznie z odpowiednim antygenem (eliminując go z otoczenia jego aktywności biologicznej) w wyniku reakcji powinowactwa. Tego typu reakcjom nie towarzyszą zmiany klasycznych właściwości fizykochemicznych (np. optycznych lub elektrochemicznych) układu, które mogłyby być odczytane przez przetwornik. Można to rozwiązać przez zastosowanie odpowiednich znaczników (ang. *label*), dowiązanych do cząsteczki biorącej udział w reakcji lub wprowadzanych bezpośrednio do roztworu próbki. Innym rozwiązaniem jest zastosowanie odpowiedniego przetwornika, którego charakterystyka (np. zmiana energii plazmonów powierzchniowych, zmiana częstotliwości drgań lub energii dyssypacji kryształu piezoelektrycznego) jest związana ze zmianami właściwości fizycznych warstwy receptorowej (będących efektem reakcji powinowactwa) – mówimy wtedy o sensorach bezznacznikowych. Kwasy nukleinowe, charakteryzujące się określonymi sekwencjami oligonukleotydów, rozpoznają nić DNA (analit) w wyniku reakcji parowania komplementarnych par zasad (cysteina-guanina, adenina-tymina). Taki sensor wykazuje specyficzność w odniesieniu do analitu jedynie wtedy, gdy w powstającej helisie DNA następuje sparowanie wszystkich par zasad. Podobnie, jak w przypadku immunosensorów, sensory DNA są znane w wersji ze znacznikiem lub bez znacznika. Najnowsze prace sugerują, że elementy rozpoznawania molekularnego biosensorów można wytwarzać syntetycznie w nanoskali (np. peptoidy – biomimetyczne polimery, oligonukleotydy, syntetyczne receptory, biokoniugaty).

Funkcjonowanie sensorów chemicznych, tak jak innych urządzeń analitycznych, jest opisywane kilkoma parametrami metrologicznymi (parametry pracy, parametry użytkowe), ważnymi z punktu widzenia użytkownika. Obok takich podstawowych parametrów jak dokładność i precyzja, do najważniejszych należą:

a) selektywność (najważniejszy parametr charakteryzujący pracę sensora) – zdolność sensora do pomiaru stężenia analitu w obecności innych składników chemicznych próbki; ze względu na specyficzność oddziaływań biologiczny materiał – analit, znacznie lepszą selektywność osiągają biosensory;
b) czułość – nachylenie krzywej odpowiedzi sensora, wyrażone jako wartość sygnału na jednostkę stężenia lub aktywności analitu (np. mV/pH);
c) zakres dynamiczny – zakres stężeń analitu, w których czułość jest większa od zera (dla sensorów i biosensorów mieści się w zakresie 10^{-1}–10^{-15} mol/L);
d) granica wykrywalności (granica detekcji) – najmniejsze stężenie analitu, które może być wykryte za pomocą sensora;
e) czas odpowiedzi – czas, po którym wyjściowy sygnał sensora osiąga 63% (t_{63}) lub 95% (t_{95}) jego wartości po nieskończenie długim czasie ustalania się równowagi, w odpowiedzi na skokową zmianę stężenia analitu;
f) czas życia (stabilność długoterminowa) – czas poprawnego działania sensora (wyniki oznaczeń nie wykraczają poza przyjętą niepewność analiz), z zaznaczeniem trybu stosowania (przechowywanie, praca).

Pierwszym historycznie sensorem chemicznym była elektroda szklana – potencjometryczny czujnik do pomiaru pH, skonstruowany

na początku XX wieku przez Klemensiewicza i Habera. Dopiero w latach 60. XX wieku opracowano kolejne czujniki tej klasy, wykorzystujące membrany stałokrystaliczne (np. elektroda selektywna na jony fluorkowe z membraną z monokryształu LaF_3) oraz membrany zawierające naturalne lub syntetyczne ligandy makrocykliczne (jonofory). Ważnym krokiem w rozwoju sensorów elektrochemicznych była tlenowa elektroda Clarka (rok 1956), która została użyta w pierwszym prototypie biosensora glukozy, czy podjęcie próby użycia piezoelektrycznych kryształów jako przetworników w sensorach czułych na zmianę masy. Dopiero w latach 70. nastąpił intensywny rozwój sensorów chemicznych – obok komercjalizowanych z powodzeniem elektrod jonoselektywnych, rozpoczęto prace nad zminiaturyzowanymi sensorami optycznymi, wykorzystującymi włókna światłowodowe, zaproponowano materiały półprzewodnikowe oparte na odpowiednio domieszkowanym SnO_2 jako przetworniki rezystancyjnych sensorów gazowych oraz półprzewodnikowe tranzystory polowe typu ISFET do pomiaru pH.

W kolejnym dziesięcioleciu uwagę skierowano na możliwość wykorzystania specyficznych oddziaływań biochemicznych (powinowactwa) w warstwach receptorowych sensorów enzymatycznych, immunosensorów, a także sensorów DNA. Urządzenia tego typu stosowały najczęściej klasyczne, spektroskopowe techniki detekcji (np. fluorescencyjne), technikę spektroskopii fali zanikającej, a także rezonansu plazmonów powierzchniowych. Z kolei sensory chemiczne o ograniczonej selektywności zostały zintegrowane w układach multisensorowych (matryce czujnikowe), które w połączeniu z odpowiednimi

technikami chemometrycznymi utworzyły komercyjnie dostępne urządzenia, tzw. elektroniczny nos i język.

Współczesne prace konstrukcyjne w tej dziedzinie dotyczą wprowadzania nanomateriałów zarówno do części receptorowej, przetwornikowej, jak i warstwy łączącej te dwa elementy, pod kątem optymalizacji parametrów pracy sensora (przede wszystkim: selektywności, czułości, stabilności). Zaawansowane technologie mikromechaniczne zostały włączone do otrzymywania nowoczesnych przetworników. Opracowywane są kolejne generacje biosensorów do wykrywania patogenów czy biomarkerów, lecz ze względu na charakter występujących oddziaływań i ograniczoną stabilność biologicznych warstw receptorowych, funkcjonują one najczęściej jako szybkie testy diagnostyczne. Analiza rozwoju i komercjalizacji sensorów chemicznych na przestrzeni lat wskazuje, że wiele grup tych urządzeń weszło na stałe do powszechnego użytku w różnorodnych dziedzinach życia (w szczególności: sensory gazowe, elektrody jonoselektywne, biosensory glukozy, biosensory DNA). Jednak mimo zastosowania nowoczesnych technologii oraz ogromnego doświadczenia zebranego przez naukowców w ciągu ostatnich dziesięcioleci, najczęściej sprzedawanym i używanym sensorem pozostaje wysokotemperaturowy czujnik tlenu (sonda lambda stosowana w motoryzacji) oraz szklana elektroda pH.

Literatura

1. Cammann K., Guibault E.A., Hall H., Kellner R., Wolfbeis O.S., „The Cambridge definition of chemical sensors", w: *Proceedings of the Cambridge Workshop on Chemical Sensors and Biosensors*, Cambridge University Press, New York 1996.

2. Hulanicki A., Głąb S., Ingman F., „Chemical sensors definitions and classification”, *Pure Appl. Chem.*, 1991, **63**, 1247–1250.

3. Wolfbeis O.S., „Probes, sensors, and labels: Why is real progress slow?”, *Angew. Chem.*, 2013, **52**, 9864–9865.

4. Eggins B.R., *Chemical sensors and biosensors*, John Wiley & Sons Ltd., England 2002.

2

Sensory elektrochemiczne

Sensory elektrochemiczne tworzą największą grupę sensorów chemicznych i pośród wszystkich sensorów chemicznych zajmują szczególne miejsce ze względu na wiele charakteryzujących je zalet, do których należą m.in.:

- dobrze poznane i opisane podstawy teoretyczne działania,
- stosunkowo proste i niedrogie oprzyrządowanie,
- niskie koszty analiz,
- niedestrukcyjny charakter analiz,
- łatwość automatyzacji analiz,
- brak wrażliwości na mętność czy zabarwienie analizowanych próbek,
- łatwość miniaturyzacji.

Sensory elektrochemiczne można podzielić ze względu na mierzony sygnał analityczny m.in. na: i) potencjometryczne, ii) amperometryczne i woltamperometryczne oraz iii) konduktometryczne. Niezależnie od zastosowanej techniki, w układzie pomiarowym muszą znaleźć się co najmniej dwie elektrody tworzące ogniwo elektrochemiczne. Procesy

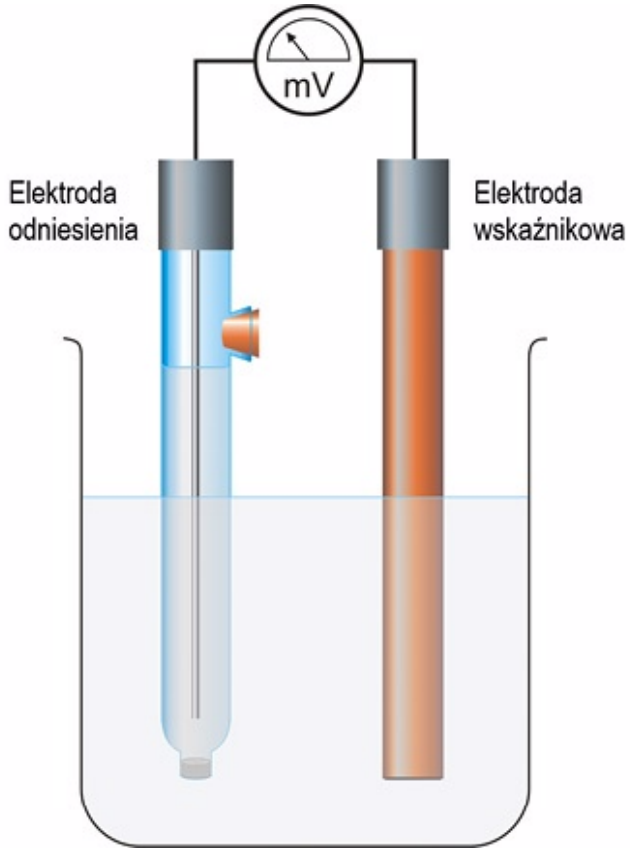
zachodzące na powierzchni co najmniej jednej z zastosowanych elektrod, w ich objętości lub roztworze mającym z nimi kontakt stanowią istotę działania sensorów elektrochemicznych.

2.1
Sensory potencjometryczne

Mariusz PIETRZAK

2.1.1
Pomiar potencjometryczny

Klasyczne pomiary potencjometryczne są prowadzone w warunkach bezprądowych ($I = 0$). W praktyce takie warunki zapewnia się poprzez zastosowanie aparatów pomiarowych (miliwoltomierzy, stacji potencjometrycznych) o wysokim oporze wewnętrznym (>100 MΩ), choć dawniej stosowano również układy kompensujące np. Poggendorfa. Układ pomiarowy składa się z dwóch elektrod, tj. elektrody wskaźnikowej, o potencjale zależnym od składu roztworu, w którym jest zanurzona, oraz elektrody referencyjnej (porównawczej, odniesienia), której potencjał w warunkach pomiaru powinien być stały, połączonych z odpowiednim urządzeniem pomiarowym, co zilustrowano na rysunku 2.1.



RYS. 2.1

Schemat potencjometrycznego układu pomiarowego [1]

Elektrody mogą być zanurzone w tym samym roztworze (taka sytuacja ma miejsce w zdecydowanej większości przypadków), ale jeśli istnieje podejrzenie, że roztwór badany może wpływać na potencjał elektrody odniesienia lub też roztwór wewnętrzny elektrody odniesienia może wpływać na wynik oznaczenia, to można ją zanurzyć w innym naczyniu zawierającym odpowiedni roztwór, a oba roztwory połączyć kluczem elektrolitycznym. Pośród elektrod wskaźnikowych można wymienić dwie podstawowe grupy elektrod, tzn. elektrody o elektronowym mechanizmie działania (elektrody I-, II- i III-rodzaju oraz elektrody redoks) i elektrody o jonowym mechanizmie działania (elektrody jonoselektywne). Te ostatnie spełniają kryteria, aby móc je

zaliczyć do sensorów chemicznych, gdyż składają się z przetwornika i warstwy receptorowej (w postaci membrany).

Analiza wykorzystująca elektrody potencjometryczne jest oparta na pomiarze siły elektromotorycznej (*SEM*) ogniwa, definiowanej jako różnica potencjałów pomiędzy elektrodą wskaźnikową a elektrodą referencyjną w warunkach bezprądowych. Potencjał elektrody wskaźnikowej zależy od składu roztworu badanego, a dokładniej od aktywności jonu (jonów) obecnych w badanej próbce. Aktywność jonu zależy od jego stężenia *c* oraz współczynnika aktywności *f* zgodnie z równaniem

$$a = c \cdot f \tag{2.1}$$

Współczynniki aktywności w roztworze można obliczyć, stosując rozszerzone prawo Debye'a–Hückla

$$\log f = \frac{-A\left|z_+ z_-\right|\sqrt{I}}{1 + aB\sqrt{I}} \tag{2.2}$$

gdzie *A* i *B* to stałe zależne od rozpuszczalnika i temperatury, z_+z_- to ładunki kationu i anionu, a *a* jest miarą największego zbliżenia jonów obecnych w roztworze. Siłę jonową roztworu (*I*) można natomiast obliczyć wg następującego równania

$$I = \frac{1}{2}\sum_{i=1} c_i \cdot z_i^{\,2} \tag{2.3}$$

Równanie to daje dobre przybliżenia dla siły jonowej mniejszej niż 0,05 mol·dm^{-3}, a w przypadku roztworów o wyższej sile jonowej należy wykorzystać równanie rozbudowane o dodatkowy człon uwzględniający stałą C

$$\log f = \frac{-A|z_+ z_-|\sqrt{I}}{1 + aB\sqrt{I}} + CI$$

(2.4)

2.1.2 Metody analizy z wykorzystaniem sensorów potencjometrycznych

Potencjometria bezpośrednia

Podstawową metodą oznaczania jonów wykorzystującą bezpośredni pomiar potencjometryczny jest metoda krzywej wzorcowej. Polega ona na określeniu aktywności (stężenia) oznaczanego jonu poprzez odczyt z krzywej kalibracji. Krzywa kalibracji elektrody jest to ustalona doświadczalnie zależność siły elektromotorycznej ogniwa od logarytmu aktywności (lub stężenia) oznaczanego jonu. Krzywą kalibracji wyznacza się, dokonując pomiaru *SEM* ogniwa w roztworach wzorcowych tego jonu o różnych aktywnościach (stężeniach). Krzywa kalibracji ma w pewnym zakresie przebieg prostoliniowy i w tym obszarze może być wykorzystana jako krzywa wzorcowa.

Unikalną cechą metod potencjometrycznych jest zależność sygnału od aktywności jonów, jednakże w wielu przypadkach analitycy preferują posługiwanie się stężeniem jonów. W takiej sytuacji jest konieczne odpowiednie przygotowanie roztworów kalibracyjnych i dopasowanie ich składu do składu roztworu próbki lub też przygotowanie próbki analitycznej wg podobnego schematu jak przygotowanie roztworów kalibracyjnych. Przyjęcie założenia, że współczynniki aktywności oznaczanego składnika we wszystkich roztworach są takie same, jest możliwe przy zachowaniu warunków pomiaru, w których siła jonowa ma dużą i jednakową dla wszystkich roztworów wartość. Takie warunki można uzyskać przez dodanie do roztworów wzorcowych matrycy (matrycą nazywamy roztwór o składzie jakościowym i ilościowym zbliżonym do próbki bez składnika oznaczanego) lub też poprzez dodanie elektrolitu podstawowego do wzorców i do próbki. Dodatek elektrolitu podstawowego musi być na tyle duży, aby różnice sił jonowych poszczególnych roztworów, wynikające z różnego ich składu, zostały zniwelowane.

W rutynowych badaniach często jest wykorzystywana kalibracja jednopunktowa, jednakże zastosowanie takiej metodyki wymaga ścisłej kontroli temperatury i znajomości czułości stosowanego sensora oraz dobrej odtwarzalności. Ważne jest, aby aktywność (stężenie) badanego jonu w roztworze kalibracyjnym była na podobnym poziomie, jak oczekiwana wartość w próbce oraz aby matryca tego roztworu była zbliżona do matrycy próbki. Do grupy metod bezpośrednich, obok metody krzywej wzorcowej, należy metoda dodatku wzorca. Polega ona na pomiarze *SEM* ogniwa w roztworze próbki i w roztworze próbki z odpowiednim dodatkiem roztworu wzorcowego oznaczanego jonu. Na podstawie tych pomiarów, wykorzystując proste równania matematyczne, można obliczyć zawartość oznaczanego jonu.

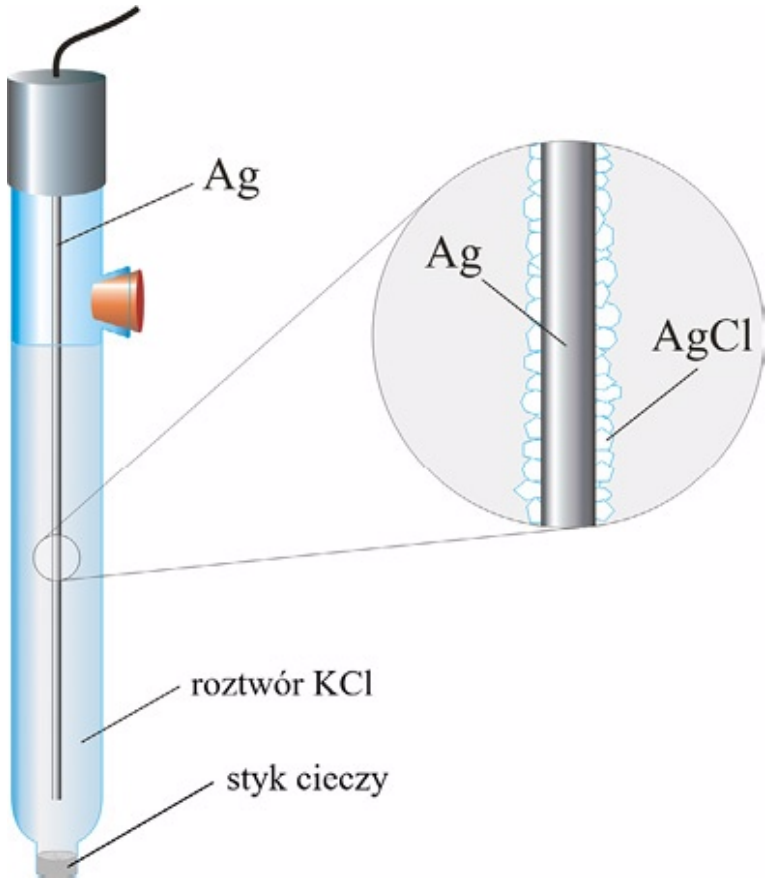
Miareczkowanie potencjometryczne

Miareczkowanie potencjometryczne polega na pomiarze zmian potencjału elektrody wskaźnikowej (mierzonego względem potencjału elektrody odniesienia) w zależności od objętości dodawanego titranta. Rejestracja tych zmian umożliwia wyznaczenie punktu końcowego miareczkowania poprzez zastosowanie metody środkowej stycznych równoległych lub obliczenie pochodnej. Potencjometryczna detekcja punktu końcowego ma wiele zalet w stosunku do klasycznej detekcji wizualnej. Miareczkowanie potencjometryczne pozwala wyznaczyć punkt końcowy w roztworach mętnych i barwnych, a także wyznaczyć kilka punktów końcowych odpowiadających zmiareczkowaniu kilku jonów lub ich postaci istniejących obok siebie w badanym roztworze. Takie oznaczenia metodami klasycznymi są utrudnione ze względu na trudności z doborem odpowiednich wskaźników wizualnych.

2.1.3
Elektrody odniesienia

Ze względu na brak możliwości pomiaru potencjału pojedynczej elektrody, pomiary potencjometryczne prowadzi się względem elektrody odniesienia, nazywanej również elektrodą referencyjną lub porównawczą. Wzorcową elektrodą odniesienia, której potencjał niezależnie od temperatury przyjmuje się jako 0 V, jest standardowa elektroda wodorowa. Jest to elektroda zbudowana z blaszki platynowej pokrytej czernią platynową zanurzona w roztworze zawierającym jony wodorowe o aktywności wynoszącej 1 i omywana gazowym wodorem o ciśnieniu 101 325 Pa. W praktyce elektrochemicznej posługiwanie się

taką elektrodą jest niewygodne i dlatego też wykorzystuje się inne elektrody porównawcze, tj. przede wszystkim elektrodę chlorosrebrową (Ag/AgCl, Cl^-) lub rzadko już obecnie, ze względu na obecność rtęci, elektrodę kalomelową (Hg/Hg_2Cl_2, Cl^-). Obie te elektrody należą do elektrod II-rodzaju. Elektroda chlorosrebrowa (jak również kalomelowa) zachowuje stały potencjał ze względu na fakt obecności stężonego roztworu KCl (3 $mol \cdot dm^{-3}$, bardziej stężony lub nasycony) będącego w kontakcie z warstwą słabo rozpuszczalnej soli naniesionej na metal (rys. 2.2). Aby elektroda ta miała kontakt z próbką, stosuje się zamknięcie w postaci porowatego ceramicznego lub szklanego spieku, lub też nylonowego włókna nazywanego stykiem cieczy lub połączeniem elektrolitycznym, będącego źródłem potencjału dyfuzyjnego (styku cieczy, E_d).



RYS. 2.2

Schemat chlorosrebrowej elektrody odniesienia [1]

Poprzez styk cieczy w bardzo nieznacznym stopniu elektrolit wewnętrzny elektrody odniesienia miesza się z próbką, jednakże objętość wycieku nie przekracza zazwyczaj kilku $nl \cdot h^{-1}$. Styk cieczy jest kontaktem dwóch fizycznie rozdzielonych roztworów. W mikrokanale/kanałach łączących roztwory występuje gradient stężeń wszystkich cząsteczek (łącznie z rozpuszczalnikiem), a tym samym gradient potencjałów chemicznych. Gradient wymusza przemieszczanie się jonów z jednego roztworu do drugiego. Ze względu na różnice we współczynnikach dyfuzji (ruchliwości) jonów następuje rozdzielenie ładunku, jednakże oddziaływania elektrostatyczne przeciwdziałają dalszej separacji tych jonów, co z kolei doprowadza do stanu stacjonarnego, w którym jony przesuwają się z taką samą szybkością wzdłuż gradientu potencjału chemicznego. Taki proces jest nazywany sprzężoną dyfuzją/migracją. W przypadku dwóch roztworów A i B o wspólnym jonie potencjał dyfuzyjny można opisać zależnością

$$E_{\mathrm{d}} = \frac{-RT}{F} \int_{A}^{B} \frac{t_i}{z_i} \, \mathrm{d} \ln a_i \tag{2.5}$$

gdzie t_i jest liczbą przenoszenia jonu *i* opisaną wzorem

$$t_i = \frac{|z_i| u_i c_i}{\sum_j |z_j| u_j c_j} \tag{2.6}$$

a *u* ruchliwością jonu.

Przyjmując kilka założeń, m.in. liniowość gradientu stężenia w ciekłym połączeniu oraz stałość współczynników aktywności, otrzymuje się równanie Hendersona

$$E_{\mathrm{d}} = \frac{\sum_i \frac{|z_i| u_i}{z_i} \left(c_{iB} - c_{iA}\right)}{\sum_i |z_i| u_i \left(c_{iB} - c_{iA}\right)} \cdot \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum_i |z_i| u_i c_{iA}}{\sum_i |z_i| u_i c_{iB}}$$

(2.7)

W skrajnych przypadkach potencjał dyfuzyjny może mieć wartość nawet 50 mV. W przypadku stosowania typowych elektrod odniesienia elektrolitem wewnętrznym jest stężony wodny roztwór KCl, który generuje niewielki potencjał dyfuzyjny, a jego minimalizacja jest możliwa i wskazana, gdy w układzie pomiarowym stosuje się klucz elektrolityczny. W takim przypadku istotne jest zastosowanie w kluczu elektrolitu o podobnej ruchliwości kationu i anionu, np. KCl, KNO_3, czy też CH_3COOLi. Należy pamiętać, że w metodach bazujących na potencjometrii bezpośredniej zmiana E_{d} wynikająca ze zmiany charakteru analizowanej próbki w stosunku do roztworu (roztworów) kalibrującego może prowadzić do znaczących błędów wyników analizy. W przypadku badania próbek biologicznych i klinicznych, a także niewodnych, kontakt elektrolitu wewnętrznego z próbką może prowadzić do denaturacji białek i ich adsorpcji lub też strącania kryształów soli elektrolitu, co może powodować częściowe lub prawie całkowite zatkanie kontaktu elektrolitycznego, a tym samym znaczące zmiany E_{d}.

Podsumowując, wartość siły elektromotorycznej, biorąc pod uwagę potencjał dyfuzyjny, można opisać zależnością

$$SEM = E_{\text{wsk}} - \left(E_{\text{ref}} + \left| E_{\text{d}} \right| \right)$$

(2.8)

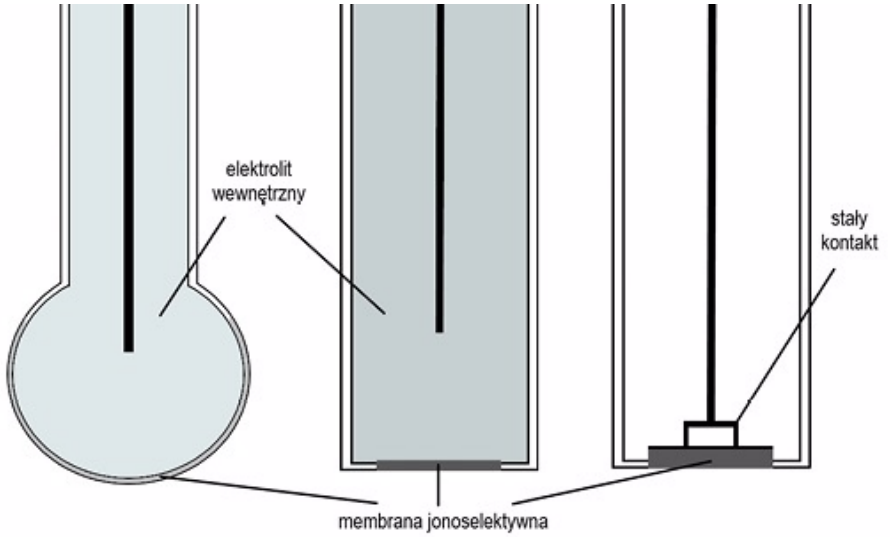
Potencjał elektrody referencyjnej w trakcie pomiaru potencjometrycznego powinien spełniać następujące wymogi, tj. być: stabilny, odwracalny i odtwarzalny. Stabilność oznacza niezmienność potencjału niezależnie od składu próbki. Odwracalność potencjału definiuje się jako szybki powrót do wartości równowagowej po przejściowej zmianie, natomiast odtwarzalność oznacza generowanie takiego samego potencjału dla kolejnych, identycznych egzemplarzy elektrody odniesienia. W przypadku elektrody chlorosrebrowej E^0 w temperaturze 25 °C wynosi 0,222 V.

2.1.4
Elektrody jonoselektywne

Elektrody jonoselektywne są zaliczane do sensorów chemicznych ze względu na obecność warstwy receptorowej w postaci membrany jonoselektywnej. Elektrody jonoselektywne mogą charakteryzować się różną budową, zarówno w obrębie membrany, jak i przetwornika, a najbardziej typowe rozwiązania konstrukcyjne zostaną omówione poniżej. Różne typy membran jonoselektywnych działają wg różnych mechanizmów, co powoduje, że potencjał elektryczny membran z danej grupy, a co za tym idzie potencjał elektrod jonoselektywnych z danej grupy, jest generowany w inny sposób i inne zjawiska są odpowiedzialne za jego zmiany. Nawet dla jednego rodzaju membran zaproponowano wiele teorii i modeli opisujących powstawanie potencjału i jego zależność od różnych parametrów. Nie chcąc

odstraszyć czytelników nadmierną liczbą równań matematycznych, odsyłam tych bardziej zainteresowanych do odpowiednich pozycji literaturowych, np. [3].

Tak jak przedstawiono na rysunku 2.3 membrana oddziela fazę ciekłej próbki od roztworu wewnętrznego elektrody lub stałego kontaktu. Potencjał elektryczny na granicy faz może powstawać w wyniku podziału elektrolitu pomiędzy te fazy lub też w wyniku adsorpcji jonów. Możliwe jest również powstanie potencjału na skutek odpowiedniego orientowania dipoli na granicy faz. Jednakże ze względu na rodzaj i skład badanych roztworów zdecydowanie dominuje mechanizm pierwszy.



RYS. 2.3

Schemat elektrod jonoselektywnych o różnej konstrukcji

Jeśli elektroda jest zanurzona w roztworze, a granica faz roztwór/elektroda jest w równowadze elektrochemicznej w stosunku do i^{zi}, to elektrochemiczny potencjał i^{zi} jest taki sam w fazie roztworu i w fazie elektrody

$$\overline{\mu}_i^{\text{roztwór}} = \overline{\mu}_i^{\text{elektroda}}$$

(2.9)

Z kolei potencjał elektrochemiczny indywiduum chemicznego znajdującego się w określonej fazie jest związany z potencjałem chemicznym tego indywiduum μ_i oraz lokalnym potencjałem elektrostatycznym Φ i stałą Faradaya (F)

$$\overline{\mu}_i = \mu_i + z_i F \Phi$$

(2.10)

Biorąc pod uwagę te zależności, potencjał na granicy faz można wyrazić równaniem

$$\varphi_b = \phi^{\text{elektroda}} - \phi^{\text{roztwór}} = \frac{\mu_i^{\text{elektroda}} - \mu_i^{\text{roztwór}}}{z_i F}$$

(2.11)

Ponieważ potencjał chemiczny można opisać zależnością (po przemilczanych tu rozważaniach termodynamicznych, z uwzględnieniem stałej gazowej, R)

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln a_i$$

(2.12)

to równanie na potencjał na granicy faz można wyrazić jako

$$\varphi_b = \phi^{\text{elektroda}} - \phi^{\text{roztwór}} = \frac{\mu_i^{\text{elektroda}} - \mu_i^{\text{roztwór}}}{z_i F} - \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{a_i^{\text{elektroda}}}{a_i^{\text{roztwór}}}$$

(2.13)

Jest to równanie znane jako równanie Nernsta. W sytuacji, gdy aktywność jonu i^{zi} jest stała w fazie elektrody, to równanie to można wyrazić jako (po wciągnięciu wartości potencjałów chemicznych do φ^0)

$$\varphi = \varphi^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln a_i^{\text{roztwór}}$$

(2.14)

Równanie to uzmysławia możliwość zastosowania elektrod jonoselektywnych jako czujników jonów obecnych w roztworze. Dodatkowo bardzo często logarytm naturalny w równaniach jest zastępowany wygodniejszym w odniesieniu do analizy chemicznej logarytmem dziesiętnym

$$\varphi = \varphi^0 + 2,303 \frac{RT}{z_i F} \log a_i^{\text{roztwór}}$$

(2.15)

Po zastąpieniu potencjału φ poprzez E, który w literaturze anglojęzycznej bywa również utożsamiany z siłą elektromotoryczną (ang. *electromotive force*, *EMF*) otrzymujemy równanie w postaci ogólnie znanej

$$E = E^0 + 2,303 \frac{RT}{z_i F} \log a_i^{\text{roztwór}}$$

(2.16)

2.1.5
Parametry pracy elektrod jonoselektywnych

Czułość elektrod jonoselektywnych

Czułość elektrod jonoselektywnych w teorii wynika z równania Nernsta (Nikolskiego– –Eisenmana) i zależy od ładunku oznaczanego jonu oraz temperatury (w 25 °C wynosi 59,16/z mV·dec^{-1}). W praktyce obserwuje się niewielkie odchylenia (± kilka %) od wartości teoretycznych (2,303 $\frac{RT}{zF}$) wynikające z wpływu potencjału dyfuzyjnego oraz innych niepożądanych zjawisk na mierzone wartości *SEM*. Większe odchylenia mogą wynikać z nierównowagowych zmian w membranie w czasie kalibracji, niewynikających wprost z oddziaływania z oznaczanym jonem głównym lub też niewystarczającego kondycjonowania elektrody przez rozpoczęciem pomiaru, tj. efektu Hulanickiego i innych zjawisk związanych z dużym gradientem aktywności jonu głównego między roztworem wewnętrznym elektrody a próbką badaną [4]. Może to skutkować znacznie większym nachyleniem krzywej kalibracji w pewnym zakresie aktywności (log *a*) niż wynikającym z równania Nernsta (Nikolskiego–Eisenmana).

Granica wykrywalności

Granica wykrywalności w przypadku elektrod jonoselektywnych jest definiowana wg IUPAC jako punkt przecięcia odcinków liniowych

krzywej kalibracji. Należy podkreślić, iż definicja ta różni się od klasycznej definicji granicy wykrywalności, stosowanej dla innych metod analitycznych, przyjmowanej jako trzykrotność poziomu szumów. W przypadku elektrod jonoselektywnych o klasycznej budowie, zawierających ciekły elektrolit wewnętrzny, zazwyczaj obserwuje się granice detekcji rzędu 10^{-6} (*a*). Zrozumienie zjawisk i konsekwencji wynikających z przepływu jonów z jednej strony membrany na drugą (z elektrolitu wewnętrznego do próbki i odwrotnie) i powstawania cienkich warstw roztworu przy membranie o innym składzie niż skład roztworu badanego, pozwoliło na znaczące obniżenie granic detekcji elektrod jonoselektywnych z membranami polimerowymi. Poprzez odpowiednie dobranie składu elektrolitu wewnętrznego i kondycjonującego lub eliminację ciekłego elektrolitu wewnętrznego i zastąpienie go warstwami umożliwiającymi przejście od przewodnictwa jonowego membrany do elektronowego przetwornika, zmiany w składzie membran (np. ograniczenie zawartości plastyfikatorów lub ich całkowita eliminacja) i ich grubości, czy też zastosowanie elektrod wibrujących lub wirujących udało się obniżyć granice detekcji elektrod jonoselektywnych o kilka rzędów, nawet do 10^{-11} (*a*) [5].

Zakres odpowiedzi liniowej

Ze względu na logarytmiczny charakter zależności mierzonego sygnału od aktywności (stężenia) oznaczanego jonu, zakres odpowiedzi liniowej elektrod jonoselektywnych (nawet tych o typowych granicach wykrywalności) jest bardzo szeroki. Jest to szczególnie widoczne w przypadku elektrody szklanej (o typowej budowie i składzie szkła),

dla której ten zakres obejmuje około 11 jednostek pH (zmiana aktywności jonów H_3O^+ o 10^{11}).

Selektywność sensorów potencjometrycznych

Pożądaną cechą elektrod jonoselektywnych (jak i każdego innego sensora chemicznego) jest dobra selektywność względem jonu oznaczanego. Składniki próbki, inne niż analit, które wpływają na mierzony sygnał analityczny (siłę elektromotoryczną, potencjał elektrody) nazywamy czynnikami przeszkadzającymi lub interferentami. Ich wpływ na potencjał elektrody wskaźnikowej został opisany przez Nikolskiego i uszczegółowiony przez Eisenmana, w postaci równania znanego jako równanie Nikolskiego–Eisenmana

$$E = E_i^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(a_i + \sum_j K_{i,j} a_j^{\frac{z_i}{z_j}} \right)$$

(2.17)

Wpływ interferentów jest opisany współczynnikami selektywności ($K_{i,\ j}$) i za każdym razem, gdy współczynnik ten mniejszy jest od 1, elektroda charakteryzuje się większą selektywnością względem jonu oznaczanego *i* (głównego) niż względem jonu przeszkadzającego *j*. W przypadku elektrod jonoselektywnych jony przeszkadzające mogą wbudowywać się w strukturę membrany lub z nią oddziaływać (w zależności od rodzaju membrany) i w ten sposób konkurować z jonami głównymi.

Pomimo stosunkowo poprawnego opisania wpływu jonów przeszkadzających na potencjał elektrod jonoselektywnych, prace prowadzone już w XXI wieku wykazały, że potencjał elektrody znajdującej się w próbce, w której jony przeszkadzające różnią się wartością (nie znakiem) ładunku od jonu przeszkadzającego, według równania Nikolskiego–Eisenmana może różnić się nawet o kilka mV od wartości wyznaczonej eksperymentalnie, co ogranicza jego zastosowanie. Na podstawie obserwacji zaproponowano nowe równanie, uwzględniające wpływ różnych jonów przeszkadzających (o ładunkach 1, 2 oraz 3, opisanych jako *i1*, *i2* i *i3*), uwzględniono również jon główny, dla którego $K = 1$. Równanie to jest mocno skomplikowane i zaleca się stosować je w przypadku przewidywania wpływu jonów przeszkadzających, tylko wtedy, gdy potencjał elektrody wskaźnikowej musi zostać wyznaczony z dużą dokładnością.

$$E = E_i^{\,0} + \frac{RT}{z_i F} \ln \left[\frac{1}{3} \sum_{i1} K_{i1}^{\frac{1}{z_i}} a_{i1} + \frac{\theta^3 \sqrt{2}}{3\left(\vartheta + \sqrt{-4\theta^3 + \vartheta^2}\right)^{\frac{1}{3}}} + \frac{\left(\vartheta + \sqrt{-4\theta^3 + \vartheta^2}\right)^{\frac{1}{3}}}{3 \cdot 2^{\frac{1}{3}}} \right] \tag{2.18}$$

gdzie

$$\theta = \left(\sum_{i1} K_{i1}^{\frac{1}{z_i}} a_{i1} \right)^2 + 3 \sum_{i2} K_{i2}^{\frac{2}{z_i}} a_{i2} \tag{2.19}$$

$$\vartheta = 2\left(\sum_{i1} K_{i1}^{\frac{1}{z_i}} a_{i1} \right)^3 + 9\left(\sum_{i1} K_{i1}^{\frac{1}{z_i}} a_{i1} \right)\left(\sum_{i2} K_{i2}^{\frac{2}{z_i}} a_{i2} \right) + 27 \sum_{i3} K_{i3}^{\frac{3}{z_i}} a_{i3} \tag{2.20}$$

Mechanizm powstawania potencjału w przypadku elektrod jonoselektywnych zależy od budowy membrany i wynika z wbudowywania się jonów w strukturę membrany krystalicznej (i szklanej, którą również czasami zalicza się do krystalicznych) lub oddziaływania jonów z membraną ciekłą, a konkretnie ze składnikiem elektroaktywnym w formie jonoforu lub wymieniacza jonowego.

Współczynniki selektywności elektrod potencjometrycznych są wyznaczane eksperymentalnie przy użyciu jednej z metod zatwierdzonych przez IUPAC. Spośród nich należy wymienić dwie najbardziej popularne tj. FIM i SSM. FIM (*fixed interference method*, metoda roztworów mieszanych) polega na kalibracji elektrody w roztworze o ustalonej aktywności jonów przeszkadzających przy użyciu roztworu jonów głównych. Bardzo istotne jest zastosowanie takiej aktywności jonów przeszkadzających, które zawierają się w odcinku prostoliniowej odpowiedzi testowanej elektrody względem tych jonów (pod nieobecność jonów głównych), dlatego też zazwyczaj stosuje się stosunkowo stężone roztwory jonów przeszkadzających (np. log $a_j = -1$). Po wykreśleniu zależności *SEM* ogniwa od log a_i, wyznacza się punkt przecięcia odcinków prostoliniowych i w ten sposób określa granicę wykrywalności (*lower detection limit*, LDL). Współczynnik selektywności wyznacza się z równania

$$a_i(LDL) = K_{i,j} a_j^{\frac{z_i}{z_j}} \tag{2.21}$$

zatem

$$\log K_{i,j} = \log a_i - \frac{z_i}{z_j} \log a_j$$

(2.22)

Metoda SSM (*separate solution method*, metoda roztworów rozdzielonych) polega na sekwencyjnym pomiarze *SEM* ogniwa zawierającego testowaną elektrodę w roztworze soli zawierającej jon główny oraz jon przeszkadzający, w obu przypadkach zazwyczaj o wysokiej aktywności. Następnie współczynnik selektywności jest wyznaczany z równania

$$\log K_{i,j} = \frac{z_i F}{2,303RT}\left(E_j - E_i\right) + \log \frac{a_i}{a_j^{\frac{z_i}{z_j}}}$$

(2.23)

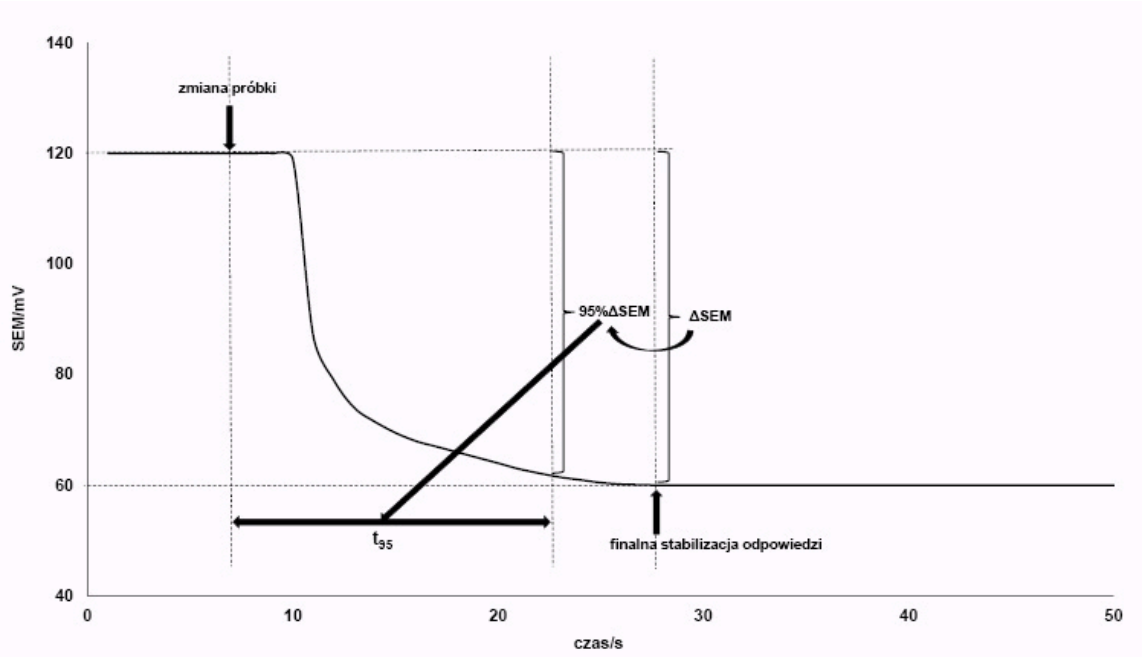
W przypadku obu omówionych metod, gdy nie jest możliwe zastosowanie roztworów jonów głównych i przeszkadzających o aktywnościach zawierających się w odcinkach prostoliniowych dających odpowiedź nernstowską, wyznaczone wartości współczynników selektywności mogą być obarczone dużymi błędami. W celu wyznaczania współczynników selektywności są wtedy stosowane inne, bardziej skomplikowane metody, wymagające wielu etapów przygotowania elektrody oraz pomiaru.

Czas odpowiedzi

Czas odpowiedzi elektrody jonoselektywnej (sensora potencjometrycznego) jest parametrem mówiącym o tym, ile czasu

potrzeba na ustabilizowanie potencjału elektrody na skutek zmiany składu roztworu, w którym jest zanurzona (bądź jest w kontakcie, np. w przypadku elektrod miniaturowych lub w układach przepływowych). Co istotne, czas odpowiedzi może zależeć od warunków prowadzenia pomiaru, w tym temperatury, a także kierunku zmian aktywności składnika, na który dana elektroda jest czuła (rośnie czy maleje). Parametr ten jest bardzo istotny, gdyż daje informacje o użyteczności elektrody i przepustowości analiz z jej wykorzystaniem. W praktyce pośród najczęściej stosowanych definicji czasu odpowiedzi stosuje się t_{95}. Jest to czas, w którym zmiana potencjału elektrody osiąga 95% pełnej zmiany (teoretycznie wartości po nieskończenie długim czasie ustalania się równowagi), co zilustrowano na rysunku 2.4. Na skutek zmiany roztworu następuje gwałtowna zmiana potencjału elektrody (*SEM* ogniwa), następnie potencjał ulega stopniowej stabilizacji, aż do momentu, gdy jego wartość przestaje się całkowicie zmieniać (nie biorąc pod uwagę szumów). Na tej podstawie wyznacza się Δ*SEM* (wartość przed zmianą roztworu; wartość po ustabilizowaniu się sygnału), następnie oblicza 95% tej wartości i odczytuje czas od zmiany próbki, po jakim sygnał zmienił się o tę wartość (o 95% Δ*SEM*). W ten sposób wyznacza się t_{95}. Obok czasu odpowiedzi wyznaczanego jako t_{95} można spotkać opracowania, gdzie czas ten definiuje się jako t_{63}. W części najnowszych prac zgodnie z wytycznymi IUPAC czas odpowiedzi bywa definiowany jako czas, po którym *SEM* nie zmienia się o więcej niż ustalona przez operatora (najczęściej badacza, który opracował tę elektrodę) wartość ($\Delta SEM/\Delta t$, np. 0,2 mV/min). W praktyce laboratoryjnej wykorzystuje się elektrody, które charakteryzują się czasem odpowiedzi w zakresie od kilku sekund do nawet kilku minut. Należy podkreślić, iż elektrody wykorzystywane w miareczkowaniach potencjometrycznych powinny charakteryzować

się jak najkrótszym czasem odpowiedzi, a w przypadku tych stosowanych w metodach potencjometrii bezpośredniej tolerancja względem tego parametru jest większa.



RYS. 2.4

Ilustracja metody wyznaczania t_{95}

Precyzja i dokładność

Na precyzję i dokładność oznaczeń przy użyciu elektrod jonoselektywnych wpływają przede wszystkim zmiany E_d, związane ze stosowaną elektrodą odniesienia, pomiędzy kalibracją a właściwą analizą, a także zakłócenia powodowane przez inne jony obecne w próbce oraz wahania temperatury.

2.1.6
Rodzaje elektrod jonoselektywnych

Elektrody jonoselektywne z membraną szklaną

Elektrody szklane stanowią grupę historycznie pierwszych membranowych elektrod jonoselektywnych (pierwszą opracował na początku XX wieku Zygmunt Klemensiewicz). Ditlenek krzemu (SiO_2) jest głównym składnikiem szkła elektrodowego, jednakże ze względu na bardzo słabą przewodność tego materiału do szkła elektrodowego są dodawane tlenki metali np. Li_2O, Na_2O czy K_2O. W czasie kontaktu szkła elektrodowego z roztworem wodnym cząsteczki wody wnikają w strukturę szkła i z nim reagują, częściowo wypierając atomy krzemu i jony metali (M) związane z atomami tlenu w strukturze szkła tj. ≡Si–O–Si≡ i ≡Si–O–M, tworząc ugrupowania ≡Si–O–H. Te z kolei ulegają dalszym reakcjom z cząsteczkami wody, dając grupy $\equiv Si–O^-$ oraz jony H_3O^+ (H^+). Powstałe grupy mogą ulegać protonowaniu i deprotonowaniu, dzięki czemu obserwuje się pH-czułość szkła elektrodowego.

W zależności od gatunku szkła, z którego jest zbudowana membrana, można otrzymać elektrody pH-czułe (skład typowej membrany: 21–33% LiO, 2–4% Cs_2O, 2–4% CaO, 3–5% La_2O_3 i pozostała część SiO_2) lub elektrody selektywne na jednododatnie kationy np. K^+, Na^+, NH_4^+ lub Ag^+ (przy odpowiedniej modyfikacji składu szkła, np. dla elektrody Na-selektywnej: 26,2% LiO, 12,4% Al_2O_3 i 61,4% SiO_2 [3]). Dodatek Al_2O_3 lub B_2O_3 do szkła

elektrodowego powoduje znaczące zmiany w selektywności membrany ze względu na stosunkowo mocne właściwości kwasowe powstałych w wyniku częściowej hydrolizy ugrupowań związanych z atomami boru lub glinu, co ogranicza selektywność względem jonów wodorowych i umożliwia oznaczanie wymienionych jonów metali.

Elektroda szklana czuła na jony H^+ jest najbardziej rozpowszechnioną i najczęściej sprzedawaną elektrodą jonoselektywną. Potencjometryczny pomiar przy użyciu tej elektrody jest najszerzej stosowaną w praktyce metodą pomiaru pH. Najczęściej szklana elektroda pH jest zbudowana z rurki szklanej zakończonej membraną szklaną o grubości około 50 μm w kształcie banieczki. Wewnątrz rurki jest umieszczona elektroda wyprowadzająca, którą jest najczęściej elektroda chlorosrebrowa (Ag/AgCl), zanurzona w roztworze HCl o stężeniu 0,1 $mol \cdot dm^{-3}$ lub buforowanym do pH 7,0 roztworze KCl o stężeniu 0,1 $mol \cdot dm^{-3}$. Popularnym rozwiązaniem konstrukcyjnym jest tzw. elektroda szklana kombinowana (zespolona). Jest ona zbudowana z klasycznej elektrody szklanej oraz elektrody odniesienia (najczęściej chlorosrebrowej) umieszczonych w jednym korpusie.

Elektrodę szklaną należy przed pomiarami zanurzyć w odpowiednim roztworze buforowym i kondycjonować. W wyniku hydrolizy na powierzchni uwodnionego szkła membrany (zewnętrzna warstwa banieczki o grubości ok. 10–100 nm w zależności od rodzaju zastosowanego szkła, nazywana również zewnętrzną warstwą żelową) ustala się równowaga

$$\equiv SiOH_{(szkło)} + H_2O_{aq} \Leftrightarrow \equiv SiO^-_{(szkło)} + H_3O^+_{aq} \qquad (2.24)$$

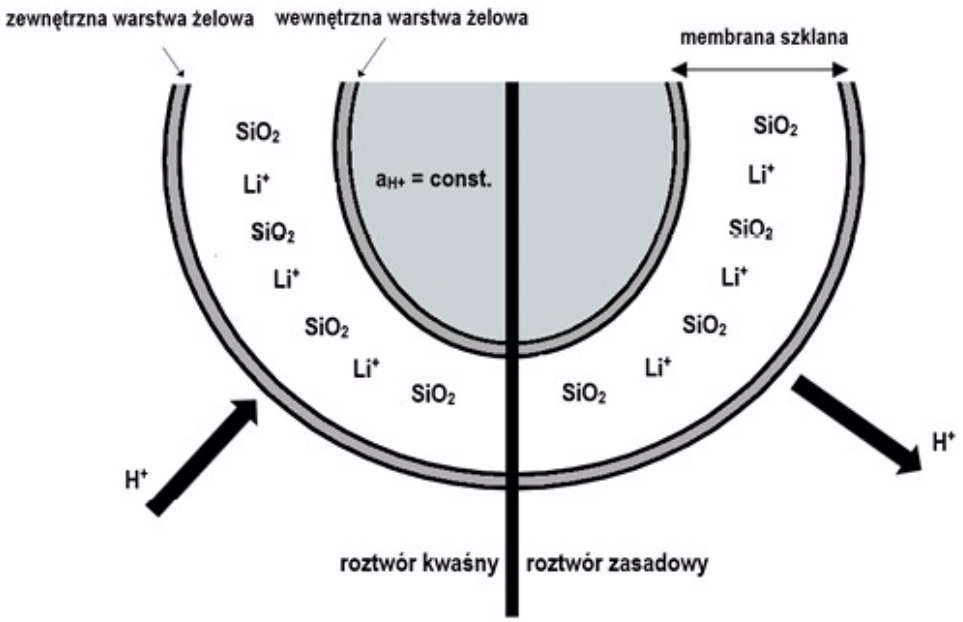
W trakcie pomiaru, w zależności od pH roztworu próbki, hydratowana warstwa membrany szklanej może ulegać reakcji

protonowania lub deprotonowania, co powoduje zmiany potencjału, który jest funkcją aktywności kationów wodorowych w roztworze próbki i zewnętrznej warstwie żelowej membrany, co schematycznie zaprezentowano na rysunku 2.5. Ze względu na ciągły kontakt wewnętrznej warstwy banieczki z roztworem wodnym o stałej aktywności jonów wodorowych, występuje tam również cienka warstwa żelowa. Jest tam również generowany potencjał wg mechanizmu opisanego dla zewnętrznej warstwy membrany. Całkowity potencjał elektrody z membraną szklaną jest zatem różnicą potencjałów powstałych na granicach faz, jednakże ze względu na fakt stałej aktywności jonów wodorowych w roztworze wewnętrznym, można go opisać za pomocą równania

$$E = E^0 + 2,303\frac{RT}{F}\log a_{H^+}{}^{\text{próbka}} \qquad (2.25)$$

Wypadkowy potencjał membrany zależy zatem jedynie od pH roztworu badanego. Istotne jest, aby w trakcie pomiaru membrana szklana znajdowała się poniżej poziomu badanego roztworu (w przypadku elektrody kombinowanej także połączenie elektrolityczne musi być zanurzone w roztworze). Elektrodę szklaną należy przechowywać w roztworze buforowym (nie w wodzie dejonizowanej). Prawidłowo pracująca elektroda szklana wykazuje prostoliniową zależność potencjału w funkcji pH w szerokim zakresie pH zgodnie z równaniem: $E = E^0 - 59,16\text{pH}$ (w temperaturze 25 °C). W roztworach mocno kwasowych (w zależności od rodzaju szkła membrany dla pH < 2, czasem pH < 1) jest obserwowany błąd kwasowy. Postuluje się, że jest on spowodowany zmniejszoną ruchliwością jonów H^+ w takim środowisku, wysyceniem szkła jonami H^+ oraz adsorpcją

innych składników roztworu na powierzchni membrany. Mierzona wartość pH, wyznaczona na podstawie teoretycznej krzywej kalibracji, jest wtedy większa od rzeczywistej. W roztworach silnie zasadowych, o dużej zawartości jonów sodu lub potasu, potencjał elektrody szklanej staje się również zależny od aktywności tych jonów (ze względu na niewystarczająco niski współczynnik selektywności $K_{H+,\ Na+}$ czy $K_{H+,\ Na+}$) i jest wtedy obserwowany błąd zasadowy. W efekcie, wyznaczane wartości pH są niższe od rzeczywistych. W sytuacji, gdy roztwory o bardzo wysokim pH są otrzymywane nie poprzez użycie wodorotlenków nieorganicznych, a np. wodorotlenku tetrametyloamonu, obserwuje się pełną liniowość krzywej kalibracji do pH 14.



RYS. 2.5

Schemat działania membrany szklanej

Elektrody szklane znajdują zastosowanie w analizie próbek o różnym charakterze, w tym również agresywnych chemicznie, mogą

także być stosowane w roztworach wodno-organicznych lub nawet organicznych (największym wyzwaniem jest wtedy dobranie elektrody odniesienia). Do wad elektrod szklanych zaliczyć należy niewielką wytrzymałość mechaniczną, kruchość banieczki szklanej oraz wrażliwość na kwas fluorowodorowy, który reaguje z membranotwórczym SiO_2.

Ciekawą alternatywą względem elektrod membranowych w przypadku pomiarów pH są tzw. elektrody tlenkowe zbudowane z metalu, w postaci drucika lub blaszki, pokrytego swoim tlenkiem. Elektrody te przez niektórych są klasyfikowane jako elektrody II-rodzaju. Pośród nich najczęściej wykorzystywana jest elektroda antymonowa, nieco rzadziej rutenowa oraz irydowa. Do ich niewątpliwych zalet należy wytrzymałość mechaniczna i łatwość miniaturyzacji, a największą wadą jest czułość na obecność związków o właściwościach redoks i węższy niż w przypadku elektrody szklanej możliwy do zmierzenia zakres pH. Na podkreślenie zasługuje również szeroki zakres temperatury, w którym takie sensory mogą być stosowane. Drugą grupą czujników, którymi zastępuje się często szklane elektrody pH, w przypadku potrzeby miniaturyzacji i dobrej wytrzymałości mechanicznej, są potencjometryczne czujniki półprzewodnikowe.

Elektrody jonoselektywne z membraną krystaliczną

W roli aktywnych składników membran krystalicznych wykorzystywane są trudno rozpuszczalne sole. Wśród membran krystalicznych można wyróżnić membrany homogeniczne i heterogeniczne. Te pierwsze

mogą być zbudowane z monokryształu odpowiedniej soli lub mieć formę membrany polikrystalicznej powstałej poprzez sprasowanie odpowiedniej liczby małych kryształów jednej lub kilku soli. Membrany heterogeniczne są zbudowane z odpowiedniej soli (lub mieszaniny soli) zdyspergowanej w obojętnym nośniku np. poli(chlorku winylu), parafinie czy też gumie silikonowej, którego zadaniem jest zapewnienie odpowiednich właściwości mechanicznych membrany. Warunkiem koniecznym zastosowania membrany krystalicznej w elektrodzie jonoselektywnej są dobre właściwości mechaniczne oraz odpowiednie przewodnictwo jonowe, które można poprawić poprzez domieszkowanie inną solą i wprowadzeniem defektów Frenkla, jak ma to miejsce w przypadku elektrody selektywnej na aniony fluorkowe z monokrystaliczną membraną z LaF_3. Domieszkowanie tej membrany EuF_2 (1% mas.) pozwala na zwiększenie przewodności od $2{,}9\cdot10^{-7}$ do $4{,}3\cdot10^{-6}$ $S\cdot cm^{-1}$. Mechanizm działania takiej elektrody związany jest z reakcją

$$LaF_3 + \text{defekt} \rightarrow LaF_2^{+} + F^{-} \qquad (2.26)$$

Elektrody krystaliczne pozwalają na oznaczanie jonów, które tworzą sole wykorzystane w membranie oraz jonów tworzących trudniej rozpuszczalne sole (z kationem lub anionem zastosowanej soli) od związku występującego w membranie, a także mające ładunek oraz promień jonowy odpowiadający sieci krystalicznej soli w membranie. W związku z tym współczynniki selektywności w przypadku takich elektrod można oszacować, znając iloczyny rozpuszczalności poszczególnych soli i przykładowo przy oznaczaniu anionów (*i* – jon główny, *j* – jon przeszkadzający) tworzących trudnorozpuszczalną sól z kationem *m*

$$K_{i,j} = f\left(\frac{I_{rmi}}{I_{rmi}}\right)$$

(2.27)

Przykładem elektrody z membraną polikrystaliczną jest elektroda stosowana do oznaczania anionów halogenkowych, której membranę stanowią sprasowane kryształy Ag_2S oraz np. AgCl. Elektroda taka umożliwia oznaczanie jonów: Cl^-, Br^-, I^-, ale także Ag^+, S^{2-} oraz SCN^-. Dodatek Ag_2S wynika z bardzo dobrego przewodnictwa kryształów tej soli. Elektrody z membraną polikrystaliczną ze sprasowanych kryształów Ag_2S znajdują zastosowanie w analizie jonów Ag^+.

Przykładem elektrody z membraną heterogeniczną może być elektroda z membraną polistyrenową z rozproszonymi kryształami szczawianu wapnia zaproponowana do oznaczania jonów Ca^{2+}. Jednakże spośród wszystkich rodzajów elektrod krystalicznych te z membranami heterogenicznymi zostały w praktyce analitycznej prawie zupełnie zapomniane.

Do wad elektrod krystalicznych zaliczyć należy trudność ich przygotowania. Dotyczy to szczególnie elektrod z membranami monokrystalicznymi, w przypadku których tylko jedna na kilka przygotowanych membran nadaje się do użycia. Jednakże raz wytworzona (przy odpowiednim traktowaniu) może służyć przez wiele lat bez znaczącej zmiany parametrów analitycznych elektrody.

Elektrody jonoselektywne z membraną ciekłą (polimerową)

Historia elektrod z membranami ciekłymi sięga połowy lat 60. ubiegłego wieku, kiedy to niezależnie od siebie dwie grupy badawcze zaproponowały zastosowanie membran z dodatkiem organicznych składników elektroaktywnych do oznaczania kationów. W przypadku takich membran są możliwe różne rozwiązania konstrukcyjne, począwszy od porowatego krążka, np. z nitrocelulozy lub ceramiki, nasączonego lipofilowym rozpuszczalnikiem organicznym z rozpuszczonym lub też ciekłym składnikiem elektroaktywnym, poprzez nieporowate membrany polimerowe z dodatkiem plastyfikatora, w którym rozpuszczone są składniki elektroaktywne, aż do membran z polimerów o stosunkowo niskiej temperaturze zeszklenia, niewymagających dodatku plastyfikatora, ze składnikiem elektroaktywnym rozpuszczonym bezpośrednio w takim polimerze. Należy podkreślić, że ze względu na prostotę konstrukcji w dzisiejszej praktyce są stosowane membrany dwóch ostatnich typów. Niezależnie od rozwiązania konstrukcyjnego membrany takie są często nazywane ciekłymi lub pseudociekłymi ze względu na współczynniki dyfuzji indywiduów w nich rozpuszczonych, które są na poziomie podobnym do lepkich cieczy (10^{-7}–10^{-8} $cm^2 \cdot s^{-1}$). Inną często funkcjonującą nazwą nawiązującą do materiału membran są membrany polimerowe. Membrany takie dają najwięcej możliwości konstrukcyjnych oraz umożliwiają oznaczanie największej liczby jonów spośród wszystkich przedstawionych membran i dlatego też zostaną omówione najbardziej wnikliwie.

Składnik elektroaktywny

Pod pojęciem składników elektroaktywnych należy rozumieć wymieniacze jonowe lub jonofory. W przypadku elektrod z membranami zawierającymi wymieniacze jonowe, selektywność jest determinowana współczynnikiem podziału jonów (*i* – główny, *j* – przeszkadzający) pomiędzy fazę membrany a wodną fazę próbki

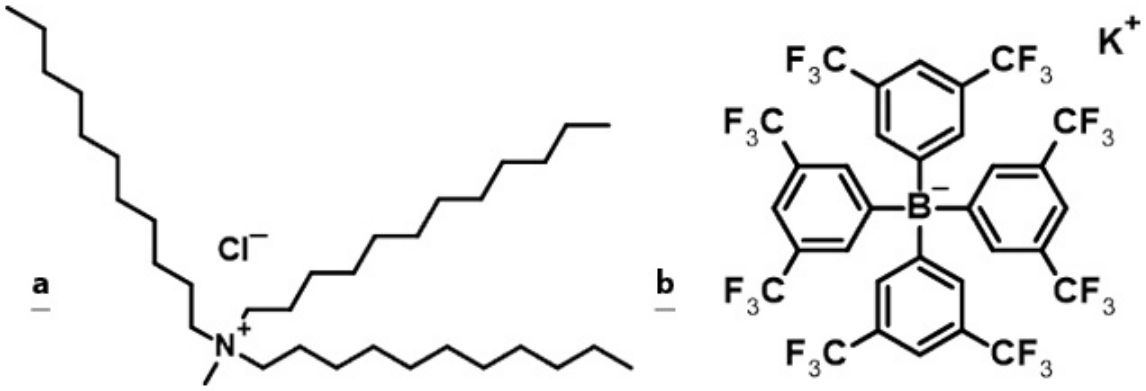
$$K_{i,j} = f\left(\frac{k_j}{k_i}\right)$$

(2.28)

W przypadku anionów selektywność jest zgodna z szeregiem Hofmeistera: ClO_4^- > SCN^- > I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > HCO_3^- > CH_3COO^- > SO_4^{2-}≈HPO_4^{2-}. Podobnie uszeregowano kationy: Cs^+ > Rb^+ > K^+ > NH_4^+ > Na^+ > Li^+ ≈ Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}. Po lewej stronie szeregów znajdują się te jony, które określa się jako lipofilowe, tj. takie, które ze względu na duży rozmiar i rozmyty ładunek są słabo hydratowane i przez to łatwo mogą pokonać granicę faz roztwór wodny/membrana organiczna. Z kolei po prawej stronie znajdują się silnie hydratowane jony, których przejście przez taką granicę faz jest związane z dużym nakładem energetycznym koniecznym do pozbycia się cząsteczek wody.

W roli wymieniaczy kationów najczęściej wykorzystuje się lipofilowe tetrafenyloborany np. tetrakis[3,5-bis(trifluorometylo)fenylo]boran potasu, a jako wymieniacze anionów stosuje się najczęściej lipofilowe czwartorzędowe sole amoniowe, np. chlorek tridodecylometyloamonu, których struktury przedstawiono na rysunku 2.6. Na selektywność wynikającą z obecności wymieniaczy jonowych można nieznacznie

wpłynąć poprzez dobór plastyfikatora i polimerowej matrycy membrany, jednakże aby uzyskać membranę o innym szeregu selektywności niż ten wynikający z lipofilowości jonów, należy zastosować jonofor.



RYS. 2.6

Struktury: a) tetrakis[3,5-bis(trifluorometylo)fenylo]boranu potasu, b) chlorku tridodecylometyloamonu

Jonofory są to lipofilowe ligandy organiczne zdolne do selektywnego kompleksowania jonów (istnieją też nieliczne jonofory oddziałujące z jonami poprzez tworzenie wiązań wodorowych). Aby uzyskać membranę o dobrej selektywności, należy wybrać jonofor, który tworzy kompleksy z badanem jonem charakteryzujące się stosunkowo wysoką stałą trwałości (β) i jednocześnie nie oddziałuje (lub słabo oddziałuje) z jonami przeszkadzającymi. Należy jednak pamiętać, że zbyt silne oddziaływanie może prowadzić do nieodwracalnego związania jonu i w konsekwencji do koekstrakcji przeciwjonu do fazy membrany, co skutkuje brakiem oczekiwanej odpowiedzi elektrody, a zatem jej bezużytecznością. W przypadku elektrod z membranami zawierającymi jonofory, selektywność jest związana zarówno ze współczynnikiem podziału jonów pomiędzy fazy,

jak i stosunkiem stałych trwałości kompleksów jonofor–jon (gospodarz–gość) dla jonów głównych i przeszkadzających

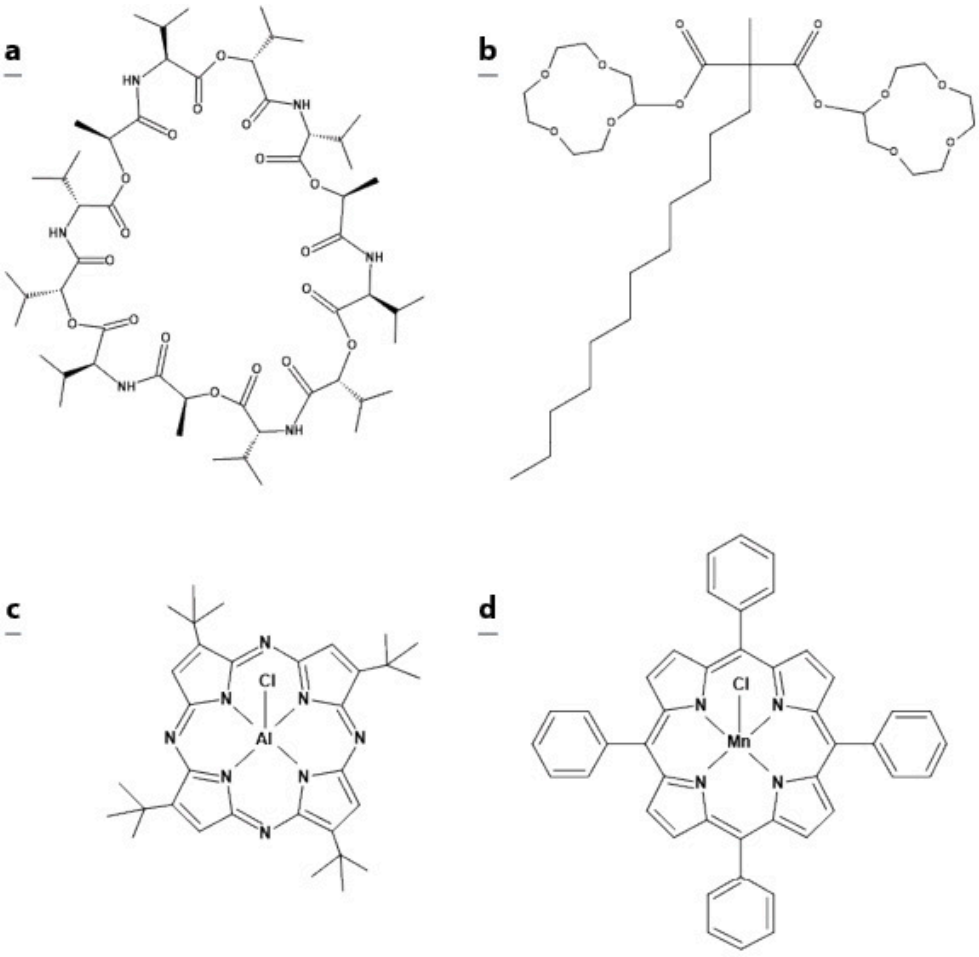
$$K_{i,j} = f\left(\frac{k_j}{k_i} \cdot \frac{\beta_{jl,n}}{\beta_{il,n}}\right)$$

(2.29)

W ciągu ostatnich 50 lat zaproponowano wiele jonoforów selektywnych względem kationów, natomiast opracowanie jonoforów selektywnych względem anionów okazało się trudniejszym wyzwaniem. Jednakże ostatnie 30 lat zaowocowało wieloma pracami dotyczącymi jonoforów anionoselektywnych i obecnie jest dostępnych wiele jonoforów selektywnych względem typowych anionów nieorganicznych.

Jonofory mogą być cząsteczkami obojętnymi lub naładowanymi i w zależności od tego faktu, a także mechanizmu ich działania, tj. mechanizmu nośnika obojętnego lub naładowanego, należy odpowiednio dobrać skład membrany jonoselektywnej. Istotne jest również, aby jonofory miały właściwości hydrofobowe i nie wymywały się do fazy wodnej próbki lub elektrolitu wewnętrznego. Pierwszymi opisanymi jonoforami były spotykane w naturze nośniki jonów – naturalne antybiotyki, np. walinomycyna (selektywna względem jonów K^+), nonaktyna (NH_4^+) i moenzyna (Na^+). Dynamicznie rozwijająca się chemia supramolekularna wniosła do potencjometrii szereg nowych syntetycznych jonoforów z rodziny eterów koronowych, kawitandów czy też kaliksarenów, które z powodzeniem wykorzystuje się do oznaczania wybranych kationów ze względu na dopasowanie przestrzenne atomów donorowych oraz odpowiednią wielkość luki wewnątrz jonoforu. W przypadku jonoforów selektywnych na aniony prym wiodą hydrofobowe metaloporfirynoidy, np. pochodna

cyjanokobalaminy (NO_2^-), metalosaleny i metalosalofeny, w przypadku których oznaczane aniony oddziałują z centrami metalicznymi w takich jonoforach. Przykładowe struktury jonoforów selektywnych względem wybranych jonów przedstawiono na rysunku 2.7.



RYS. 2.7

Struktury: a) walinomycyny (K^+), b) jonoforu sodowego VI, c) tetraazaporfiny glinowej (F^-), d) tetrafenyloporfiryny manganowej (Cl^-)

Sól lipofilowa (dodatki jonowe)

Aby elektroda jonoselektywna z membraną ciekłą charakteryzowała się odpowiedzią zgodną z równaniem Nernsta, membrana musi mieć właściwości jonowymienne. W przypadku jonoforów nieobdarzonych ładunkiem jest to realizowane poprzez dodatek lipofilowej soli o właściwościach wymieniacza jonowego. Rolą dodatków jonowych jest również stabilizacja w fazie membrany naładowanego kompleksu jonofor–jon lub też samego jonoforu w sytuacji, gdy ma on ładunek. Dodatek soli lipofilowej zapobiega koekstrakcji przeciwjonu z próbki i utrzymuje stałe stężenie jonu głównego w membranie. Oprócz tego dodatki jonowe obniżają opór elektryczny membrany (co niweluje szumy na mierzonym sygnale) i skracają czas odpowiedzi elektrody. Jako dodatek anionowy (w przypadku jonoforów kationoselektywnych niemających ładunku i anionoselektywnych naładowanych dodatnio) stosuje się zazwyczaj lipofilowe pochodne tetrafenyloboranów, natomiast jako dodatek kationowy (w przypadku jonoforów kationoselektywnych naładowanych ujemnie i anionoselektywnych niemających ładunku lub działających wg mechanizmu nośnika obojętnego) najczęściej stosuje się lipofilowe czwartorzędowe sole amoniowe. Optymalny stosunek stężenia soli lipofilowej do jonoforu zależy od ładunku jonu głównego i jonów przeszkadzających, a także stechiometrii tworzenia kompleksów z jonoforem i zazwyczaj jest ustalany eksperymentalnie.

Plastyfikator

Plastyfikator stanowi rozpuszczalnik pozostałych składników membrany. Jest to zazwyczaj lepka ciecz organiczna o wysokiej temperaturze wrzenia. Funkcją plastyfikatora jest obniżenie temperatury zeszklenia membrany do temperatury poniżej temperatury, w której jest stosowana elektroda. Ze względu na fakt, że stosowane plastyfikatory różnią się polarnością (przenikalnością elektryczną), mają one wpływ na właściwości membrany (w tym na kompleksowanie jonów przez jonofory). Najczęściej stosowanymi plastyfikatorami w przypadku membran jonoselektywnych są: sebacynian dioktylu, eter *o*-nitrofenylooktylowy czy ftalan dioktylu[1]. Użycie plastyfikatorów powoduje ograniczenie czasu życia elektrod, pogorszenie granicy wykrywalności i zmniejszenie ich biokompatybilności ze względu na wymywanie się plastyfikatora wraz z innymi składnikami membrany do badanych roztworów, a także problemy z adhezją membran do podłoża.

Polimer

Polimer jest odpowiedzialny za mechaniczne właściwości membrany i stanowi niejako jej rusztowanie, a jego właściwości chemiczne praktycznie w ogóle lub tylko nieznacznie wpływają na selektywność membrany. W tej roli najczęściej stosuje się wysokocząsteczkowy poli(chlorek winylu) (PVC, PCW). Typowo stanowi on około 33% mas. membrany. Ze względu na jego wysoką temperaturę zeszklenia, jest wymagany dodatek plastyfikatora i to w ilości znacznie przewyższającej zawartość polimeru (około 66%). Handlowo dostępny jest również

PCW modyfikowany grupami karboksylowanymi (1,8; 5 oraz 10%), które mogą funkcjonować jako wewnętrzne dodatki jonowe (ulegają częściowej dysocjacji), a także umożliwiają chemiczne dowiązanie innych składników do membrany. Dodatkowo plastyfikowane membrany z karboksylowanego PCW charakteryzują się lepszą adhezją do podłoża niż plastyfikowane membrany z niemodyfikowanego PCW.

Dzięki dobrym właściwościom adhezyjnym oraz znakomitym właściwościom mechanicznym jako polimer do konstrukcji membran jonoselektywnych proponowano gumę silikonową. Jednakże jej zastosowanie jest mocno ograniczone ze względu na słabą kompatybilność dostępnych jonoforów i dodatków jonowych oraz słabą przewodność wytworzonych membran.

Dobrymi właściwościami mechanicznymi, dobrą adhezją do podłoża oraz wysoką biozgodnością charakteryzują się poliuretany. Niektóre z tej grupy polimerów, np. Tecoflex™ SG-80A, charakteryzują się dobrą kompatybilnością z jonoforami oraz dzięki niskiej temperaturze zeszklenia mogą służyć do wytwarzania membran jonoselektywnych nawet bez dodatku plastyfikatora (składniki elektroaktywne są wtedy rozpuszczone w polimerze).

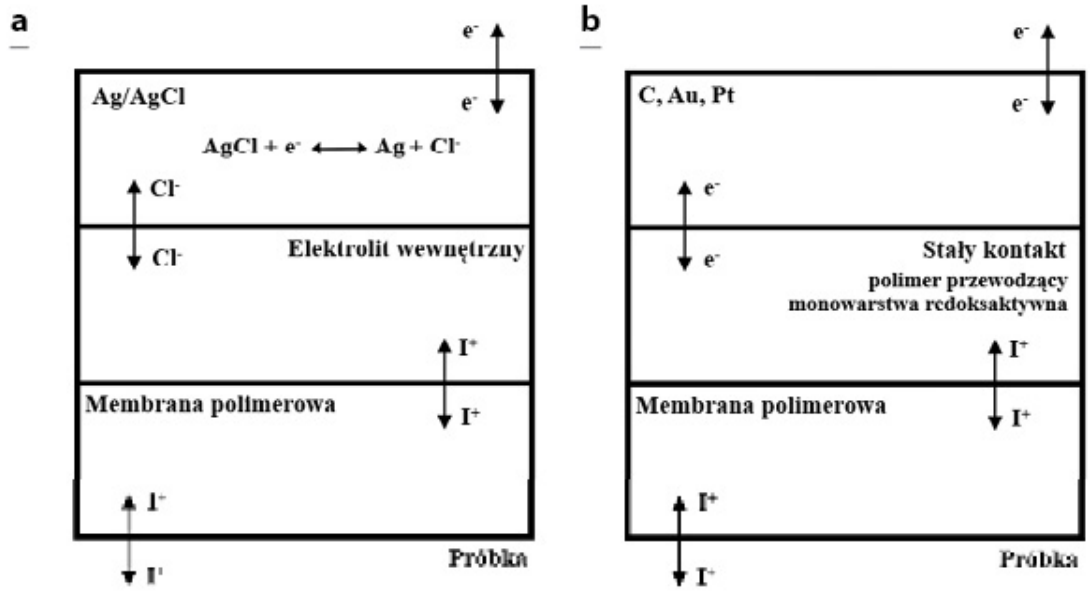
Kopolimery i terpolimery akrylanów (np. butylu, izodecylu), metakrylanów (np. decylu) i akrylonitrylu również mogą być zastosowane do wytwarzania membran jonoselektywnych. Poprzez odpowiednie dobranie monomerów i ich stosunku możliwe jest otrzymanie membran o niskiej temperaturze zeszklenia i dobrej adhezji do podłoża. Co istotne, membrany takie są zazwyczaj polimeryzowane na skutek inicjacji termicznej lub optycznej *in situ* na powierzchni przetworników (co jest wygodne przy wytwarzaniu miniaturowych elektrod jonoselektywnych), choć możliwe jest także ich wcześniejsze przygotowanie i montowanie w korpusach elektrod, jak w przypadku

innych membran polimerowych. Poprzez zastosowanie dodatków jonowych lub jonoforów modyfikowanych ugrupowaniami winylowymi możliwe jest ich dowiązanie do membrany na etapie polimeryzacji, co znacząco wydłuża czas życia elektrod, ze względu na brak możliwości wymycia składników elektroaktywnych z membrany. W przypadku zastosowania takich membran należy pamiętać o znacząco niższych (niż dla plastyfikowanego PCW) współczynnikach dyfuzji jonów w takim materiale, co predestynuje takie membrany do zastosowania w elektrodach charakteryzujących się niską granicą wykrywalności, dzięki zmniejszeniu strumieniu jonów w membranie.

2.1.7 Miniaturyzacja elektrod jonoselektywnych

W przypadku elektrod z membranami szklanymi i ciekłymi o klasycznych wymiarach najczęściej stosuje się ciekłe elektrolity oraz elektrodę Ag/AgCl jako elektrodę wewnętrzną. Zastosowanie elektrolitu wewnętrznego zawierającego jony chlorkowe skutkuje poprawnym zdefiniowaniem poszczególnych granic faz i przekształceniem przewodnictwa jonowego membrany do elektronowego drutu srebrowego (rys. 2.8). Obok jonów chlorkowych elektrolit wewnętrzny zazwyczaj zawiera również jony główne, na które dana membrana jest selektywna. W przypadku elektrod z membranami krystalicznymi też stosuje się ciekłe elektrolity wewnętrzne, jednakże są również spotykane rozwiązania konstrukcyjne z tzw. stałym kontaktem (rys. 2.3). Oznacza to, że membrana od strony wewnętrznej kontaktuje się z przewodnikiem elektronowym, np. w postaci blaszki srebrowej. Aby

zwiększyć powierzchnię kontaktu często na membranę krystaliczną od strony niekontaktującej się z próbką naparowuje się cienką warstwę metalu, najczęściej srebra, co w przypadku membran zawierających Ag_2S (większość membran polikrystalicznych zawiera tę sól ze względu na dobrą przewodność, którą zapewnia) umożliwia prawidłowe przetworzenie przewodnictwa jonowego na elektronowe (wg mechanizmu elektrody II-rodzaju). Jednakże w przypadku elektrod z membranami polimerowymi, które pozwalają na oznaczanie najszerszego spektrum analitów, takie podejście nie jest możliwe. Należy podkreślić, że membrany polimerowe cieszą się dużym zainteresowaniem również ze względu stosunkowo łatwą miniaturyzację sensorów z warstwą receptorową w takiej postaci. Ze względu na potrzebę analiz próbek o małych objętościach, wymagania kompatybilności z miniaturowymi systemami analizy chemicznej oraz czynniki ekonomiczne, decydujące zarówno o minimalizacji kosztów wytwarzania samych sensorów, jak i obniżaniu kosztów jednostkowej analizy, opracowano wiele sensorów zminiaturyzowanych o różnej architekturze. Należy podkreślić, że rozwiązania konstrukcyjne miniaturowych sensorów wykorzystują w szerokim stopniu nowoczesne technologie produkcji elektronicznych układów scalonych, osiągnięcia technologii krzemowych, mikromechaniki, mikro- i nanotechnologii, technik drukarskich oraz nowe (często elastyczne) tworzywa sztuczne i materiały ceramiczne.



RYS. 2.8

Schemat przetwarzania przewodnictwa jonowego membrany polimerowej do elektronowego przetwornika w przypadku elektrody: a) z ciekłym elektrolitem wewnętrznym, b) stałym kontaktem

Obecność ciekłego elektrolitu wewnętrznego stwarza wiele praktycznych problemów w konstrukcji miniaturowych sensorów, a ponadto ogranicza komfort pracy z elektrodami jonoselektywnymi z powodu konieczności jego uzupełniania i braku możliwości stosowania w dowolnym położeniu (bokiem, do góry membraną), dlatego podjęto próby jego wyeliminowania. Najprostszym przykładem tego typu urządzeń są tzw. elektrody powlekane (*coated-wire electrodes*) zaproponowane już w latach 70. XX wieku, w których metalowy drut (np. Au, Cu, Pt) jest bezpośrednio pokrywany warstwą polimerowej membrany jonoselektywnej. Niestety elektrody powlekane charakteryzują się niestabilnym potencjałem w czasie, przy porównywalnych do klasycznych elektrod jonoselektywnych, pozostałych parametrach pracy. Wynika to z braku jednoznacznie zdefiniowanego mechanizmu przekształcenia przewodnictwa jonowego

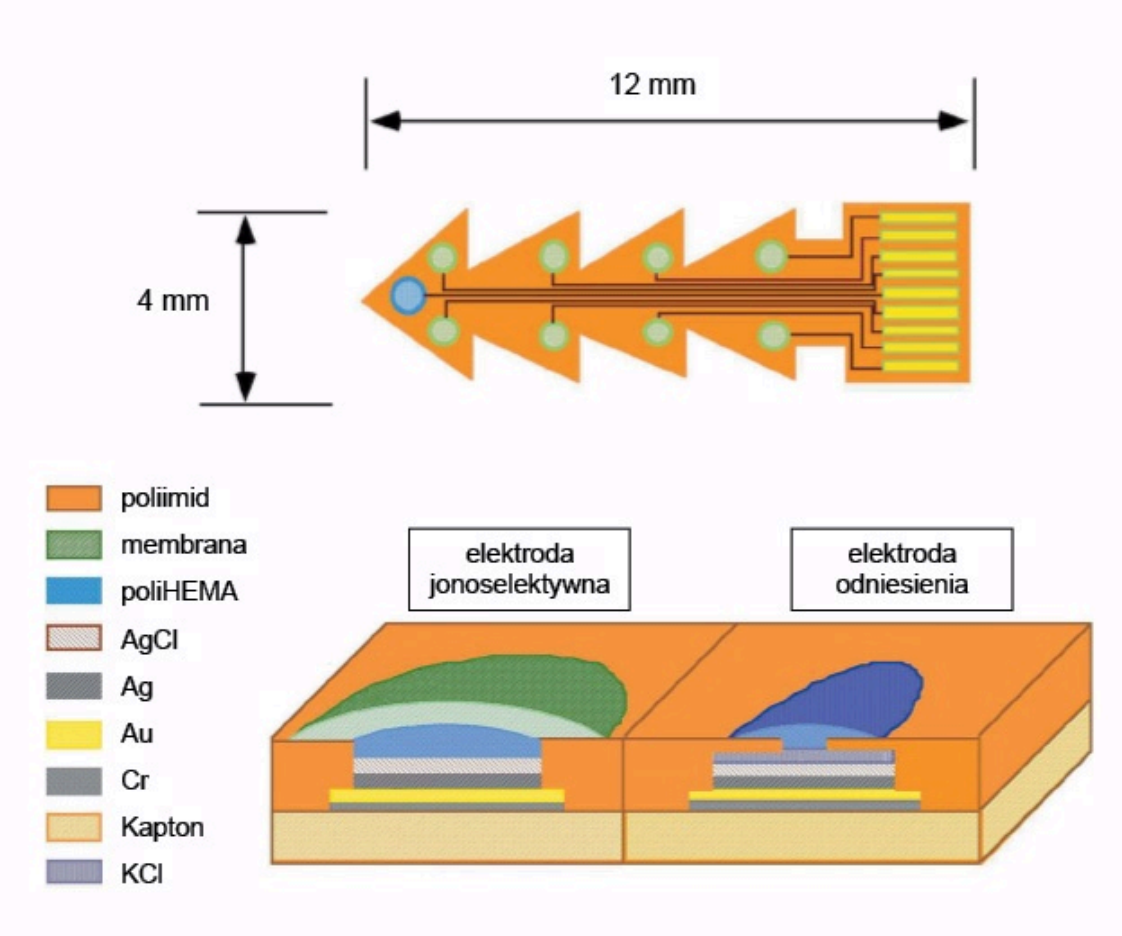
membrany do przewodnictwa elektronowego drutu. Ze względu na przepuszczalność stosowanych membran polimerowych dla wody i gazów, pomiędzy drutem a membraną tworzy się zazwyczaj cienka warstwa roztworu o zmiennym składzie.

Innym zaproponowanym rozwiązaniem było zastosowanie przetwornika z elektrodą srebrową pokrytą chlorkiem srebra(I) w postaci drutu albo układu planarnego, który modyfikowano hydrożelem np. poli(metakrylanem 2-hydroksyetylu) (poliHEMA) nasączonym odpowiednim elektrolitem zawierającym aniony chlorkowe. Niestety ze względu na przytoczony już fakt przepuszczalności membran polimerowych dla wody, w trakcie pomiarów dochodziło do pochłaniania wody przez hydrożel, jego pęcznienia i w konsekwencji oderwania membrany od przetwornika.

Najbardziej skutecznym rozwiązaniem okazało się pokrycie przetwornika polimerem przewodzącym (przetworniki metaliczne i węglowe) lub odpowiednią monowarstwą redoksaktywną (przetwornik złoty). Oba rodzaje modyfikacji oprócz gwarancji poprawnej zamiany przewodnictwa jonowego na elektronowy, ograniczają tworzenie się warstwy wodnej i niwelują wpływ gazów (O_2 – wpływającego na potencjał redoks i CO_2 – wpływającego na pH) na potencjał tak skonstruowanych czujników (rys. 2.8. b). Stały kontakt w postaci polimeru przewodzącego może być przygotowany poprzez elektropolimeryzację na powierzchni przetwornika lub jego pokrycie wcześniej zsyntezowanym polimerem. W tej roli testowano m.in. polipirol, politiofen, polianalinę, jednak najbardziej skutecznymi okazały się poli(3,4-etyleno-1,4-dioksytiofen) i poli(3-oktylotiofen) (POT) domieszkowane odpowiednio poli(sulfonianem styrenu) i tetracyjanochinodimetanem. Badania nad opracowaniem stałych kontaktów, których użycie gwarantuje pełną stabilność potencjału

w czasie, ciągle trwają i w ostatnim okresie badacze skierowali swą uwagę ku nanocząstkom, głównie węglowym, takim jak nanorurki czy grafen. W przypadku elektrod jonoselektywnych ze stałym kontaktem, ze względu na dominującą architekturę planarną, istotna jest dobra adhezja membrany do podłoża i w związku z tym najczęściej wykorzystuje się te polimery membranotwórcze, które się taką cechą charakteryzują.

Należy zauważyć, że równolegle trwają również prace badawcze nad miniaturyzacją elektrod odniesienia. Wyzwanie to okazało się być jednak bardziej wymagające niż miniaturyzacja elektrod jonoselektywnych. Zaproponowano kilka rozwiązań począwszy od zastosowania elektrod pseudoreferencyjnych, np. chlorosrebrowych, w sytuacji, gdy przewidywano, że badane próbki będą zawierały chlorki o stałej (lub ulegającej nieznacznym wahaniom) aktywności. W tej roli stosuje się również elektrody srebrowe z naniesioną membraną polimerową z dodatkiem rozproszonych kryształów AgBr, AgCl i nanocząstek srebra. Ciekawym rozwiązaniem są elektrody z kontaktem stałym, np. w postaci polimerów przewodzących, i membranami polimerowymi, w których jako składnik elektroaktywny znajduje się sól o lipofilowym kationie i anionie, np. tetrabutyloboran tetrabutyloamonu lub tetrakis(4-chlorofenylo)boran tetradodecyloamonu, co powoduje, że sól taka nie ma właściwości jonowymiennych i nie generuje zmian potencjału membrany na skutek zmian składu roztworu. Ponadto opisano wykorzystanie w roli elektrod referencyjnych elektrod z membranami polimerowymi z dodatkiem cieczy jonowych.



RYS. 2.9

Schemat budowy miniaturowego sensora potencjometrycznego zaproponowanego do oznaczania wybranych kationów w czasie operacji na otwartym sercu królika. Wykorzystano za zgodą American Chemical Society, Copyright (2000) [6]

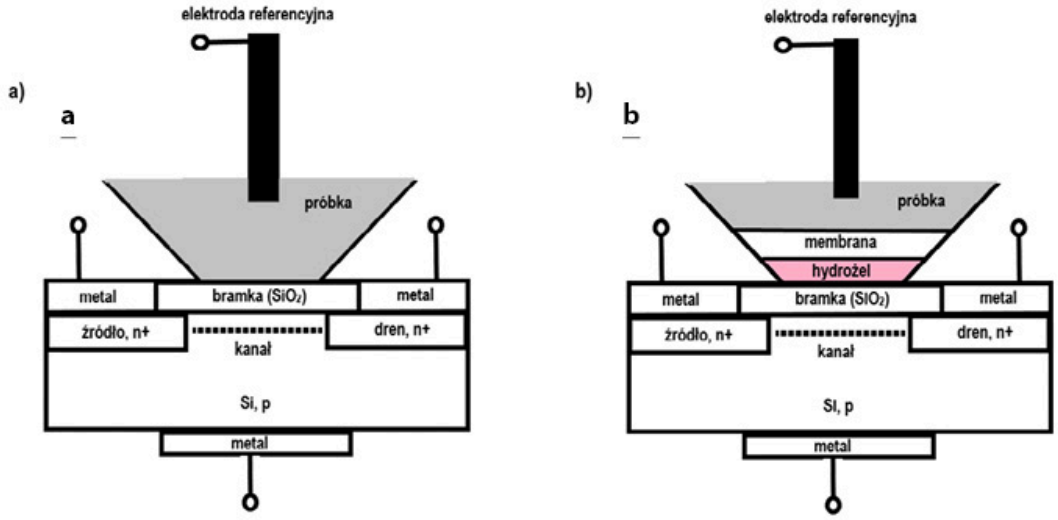
Przykładem zminiaturyzowanej potencjometrycznej platformy zastosowanej do analizy elektrolitów w tkance serca może być opisany przez E. Lindnera i R. Bucka czujnik pH i jonów K^+, Na^+ i Ca^{2+} przedstawiony na rysunku 2.9 [6]. Autorzy skonstruowali elektrody jonoselektywne z membranami polimerowymi o planarnej budowie z warstwą pośrednią (kontaktem) w postaci poliHEMA na podłożu z tworzywa sztucznego, wykorzystując membrany z modyfikowanego (karboksylowanego lub aminowanego) PCW zawierające plastyfikatory

oraz odpowiednie jonofory. W jednym z rozwiązań autorzy rozważali również zastąpienie membrany pH-czułej warstwą Ir/IrO_2.

2.1.8
Półprzewodnikowe sensory potencjometryczne

Tranzystory polowe (*field effect transistor*, FET) już w latach 70. XX wieku znalazły zastosowanie w analizie chemicznej. Sensory, w których jako przetworniki wykorzystano tego typu urządzenia, znalazły najszersze zastosowanie do pomiaru pH (*ion-sensitive FET*, ISFET), choć proponowano też rozwiązania wykorzystujące membrany polimerowe o podobnym składzie, jak te stosowane w elektrodach jonoselektywnych, konstruując MEMFET i CHEMFET (*membrane FET*, *chemically modified FET*) i w ten sposób nadając selektywność umożliwiającą oznaczanie innych jonów. Jonoczuły tranzystor polowy składa się z krzemowego podłoża typu p, zawierającego dwa obszary typu n – źródło i dren (ang. *source, drain*), na który jest nałożona warstwa ditlenku krzemu tzw. bramka (ang. *gate*), kontaktująca się z roztworem próbki (rys. 2.10). W jonoczułym tranzystorze polowym prąd elektryczny przepływa pomiędzy źródłem a drenem przez kanał, którego przewodnictwo jest funkcją pola elektrycznego, prostopadle skierowanego do kierunku prądu. Z tego powodu wartość prądu zależy także od potencjału elektrochemicznego na granicy faz bramka/roztwór. Przy stałym potencjale, zmiany potencjału bramki mogą być kompensowane potencjałem o odwrotnej polaryzacji w stosunku do potencjału bramki SiO_2, przyłożonym do elektrody odniesienia. Ze względu na możliwość protonowania lub

deprotonowania SiO_2 będącego w kontakcie z roztworem wodnym, zmiany pH próbki powodują zmiany potencjału powierzchni bramki i urządzenia ISFET mogą być stosowane w praktyce do pomiaru pH. Jako materiał bramki ISFET mogą być stosowane także inne związki o charakterze amfoterycznym, np. Si_3N_4, Al_2O_3 oraz Ta_2O_5. Czułość oferowanych przez producentów urządzeń typu ISFET wynosi ok. 59 mV/pH praktycznie w całym zakresie pH, a czas ich odpowiedzi to nie więcej niż 5 sekund. Ze względu na te parametry oraz trwałość wynikającą z wytrzymałości mechanicznej znacznie przewyższającej elektrodę szklaną, tranzystory ISFET znajdują zastosowanie tam, gdzie zastosowanie elektrod szklanych jest niemożliwe lub trudne. Należy pamiętać, że w układzie pomiarowym znajduje się elektroda odniesienia, najczęściej jest to elektroda chlorosrebrowa z hydrożelowym elektrolitem wewnętrznym.



RYS. 2.10

Schemat budowy: a) ISFET oraz b) CHEMFET

Selektywność ISFET może być modyfikowana poprzez nałożenie na bramkę jonoselektywnej membrany polimerowej o składzie podobnym

do składu membran elektrod jonoselektywnych, co pozwala na opracowanie sensorów czułych na inne jony niż H^+. Podobnie jak w przypadku elektrod jonoselektywnych na stałym podłożu, prawidłowe działanie takich sensorów wymaga obecności roztworu elektrolitu wewnętrznego, np. w postaci warstwy hydrożelu. Sensor o takiej konstrukcji to CHEMFET. Możliwe jest także skonstruowanie sensorów bez warstwy elektrolitu (MEMFET), ale, podobnie jak w przypadku elektrod powlekanych, sensory takie charakteryzują się wieloma wadami.

Najnowocześniejsze jonoczułe tranzystory polowe są oparte na strukturach krzemowych i wytwarzane przy użyciu standardowych procesów CMOS (*complementary metal-oxide-semiconductor*). Obecnie uwaga badaczy pracujących nad rozwojem tranzystorów polowych i zastosowaniem tych urządzeń do analizy chemicznej skupia się przede wszystkim nad wykorzystaniem osiągnięć nanochemii i nanotechnologii zarówno w kwestiach konstrukcyjnych, jak i składu warstw chemoczułych. Należy jednak zauważyć, że ze względu na możliwość stosowania tanich podłoży z tworzyw sztucznych czy papieru, dużo większy nacisk kładzie się na rozwój miniaturowych elektrod jonoselektywnych.

2.1.9 Zastosowanie sensorów potencjometrycznych

Membranowe elektrody jonoselektywne ze względu na swoje zalety znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, przemysłu i życia codziennego. Co istotne, elektrody jonoselektywne, tak jak inne

sensory chemiczne mogą być używane w zautomatyzowanych analizach typu *on-line* lub *in-line*, co umożliwia stosowanie ich w kontroli analitycznej wielu procesów. Jak już wspomniano, najpowszechniej wykorzystywaną elektrodą potencjometryczną jest elektroda szklana, która ze względu na różnorodność zastosowań jest produkowana w wielu kształtach i rozmiarach dopasowanych do charakteru analizowanych próbek. Na przykład są dostępne elektrody szklane przeznaczone specjalnie do analizy pH serów, mięs, gleby, wody akwariowej czy też próbek w rurkach (naczyniach) do analizy NMR. Do istotnych zastosowań elektrod jonoselektywnych należy analiza kliniczna i badania zawartości elektrolitów w płynach ustrojowych. Należy pamiętać, że analiza potencjometryczna umożliwia badanie aktywności jonów, co w badaniach medycznych ma bardzo duże znaczenie. Najbardziej typowe pola zastosowań i badane anality przedstawiono w tabeli 2.1.

TABELA 2.1

Przykłady zastosowań sensorów potencjometrycznych

Pole zastosowań	Rodzaj próbek	Przykłady analitów
Analiza kliniczna	Krew, osocze, mocz, ślina	pH, K^+, Na^+, Li^+, Ca^{2+}, Cl^-
Przemysł rolny	Gleba, mleko, mięso, warzywa	pH, K^+, Na^+, NH_4^+, Ca^{2+}, NO_3^-
Badania środowiskowe	Woda, gleba, ścieki, rośliny	pH, NH_4^+, Ag^+, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Cd^{2+}
Przemysł farmaceutyczny	Preparaty, półprodukty	pH, aminy, salicylany
Przemysł kosmetyczny	Szampony, kremy, toniki, pasty	pH, K^+, Na^+, F^-, surfaktanty
Przemysł spożywczy	Soki, napoje, wina, dżemy, sery, jogurty, kefiry	pH, Na^+, NH_4^+, Ca^{2+}, NO_3^-, CH_3COO^-
Przemysł ciężki	Ścieki, roztwory, odpady	pH, NH_4^+, Ag^+, Cu^{2+}, Cl^-, F^-

W XXI wieku elektrody jonoselektywne zostały po raz pierwszy wykorzystane w czasie misji kosmicznych i zastosowane jako część specjalnie skonstruowanego układu analitycznego do badania składu gleby Marsa. W ciągu kilku ostatnich lat pojawiły się pierwsze doniesienia o konstrukcji jednorazowych miniaturowych sensorów potencjometrycznych na elastycznych i tanich podłożach z tworzyw sztucznych lub papieru, które pozwalają na oznaczanie wybranych jonów np. w pocie (bezpośrednio na skórze) lub ślinie. Dzięki technice sitodruku produkcja przetworników na takich podłożach, szczególnie z wykorzystaniem past węglowych, jest niezwykle tania i ogólnie dostępna, a membrany polimerowe nakładane mogą być na tego typu podłoża również metodami zautomatyzowanymi.

2.2 Sensory amperometryczne i woltamperometryczne

Marta JARCZEWSKA

2.2.1 Pomiar amperometryczny

Technika amperometrii polega na pomiarze sygnału prądowego w funkcji czasu przy określonej wartości potencjału. Przyłożenie odpowiedniego potencjału do elektrody pracującej względem elektrody odniesienia powoduje utlenienie bądź redukcję jednego lub kilku

analitów. Pomiar amperometryczny jest zazwyczaj wykonywany przy użyciu układu trójelektrodowego (rys. 2.11), choć możliwe jest również zastosowanie jedynie pary elektrod pracującej i odniesienia. Wszystkie elektrody są umieszczone w roztworze zawierającym analit oraz elektrolit podstawowy, który sam nie ulega reakcjom redoks, a jego zadaniem jest ograniczenie występowania transportu na zasadzie migracji oraz obniżenie oporności roztworu [7]. Główną wadą tej techniki jest jej zastosowanie jedynie w przypadku oznaczania analitów wykazujących właściwości elektroaktywne, a także ograniczona czułość i selektywność, co w przypadku obecności kilku analitów charakteryzujących się właściwościami elektrochemicznymi wymaga dobrania odpowiedniego potencjału, zastosowania właściwego materiału elektrodowego bądź dodatkowej modyfikacji powierzchni elektrody. Inną możliwością jest zmiana stałych szybkości reakcji redoks poprzez wykorzystanie zjawiska elektrokatalizy bądź wywołanie zmian oporu przenoszenia masy, np. poprzez umieszczenie dodatkowej membrany obdarzonej ładunkiem na powierzchni elektrody, co może prowadzić do odpychania interferentów obdarzonych tym samym ładunkiem [8].

2.2.2
Pomiar woltamperometryczny

Inną grupą technik opierających się na pomiarze sygnału prądowego w funkcji przyłożonego potencjału, które wykorzystują identyczny układ trójelektrodowy, są techniki woltamperometryczne. Różnicą w odniesieniu do technik amperometrycznych jest pomiar sygnału prądowego w funkcji przyłożonego do elektrody pracującej potencjału,

który zmienia się w czasie według zadanego programu. Do podstawowych technik należy zaliczyć woltamperometrię liniową (LSV) [9] oraz woltamperometrię cykliczną (CV) [10]. W przypadku woltamperometrii cyklicznej pomiar przeprowadzany jest dwuetapowo w wyniku przyłożenia potencjału początkowego i jego zmiany do określonego potencjału końcowego, a następnie odwrócenia kierunku polaryzacji i powrotu do początkowej wartości potencjału. Technika ta jest użyteczna w analizie jakościowej, pozwala również na zdefiniowanie parametrów kinetycznych oraz umożliwia określenie odwracalności procesu redoks czy też występowanie zjawiska adsorpcji na powierzchni elektrody pracującej. Pik prądowy w przypadku całkowicie odwracalnego układu jest zdefiniowany za pomocą równania Randlesa–Sevcika:

$$i_p = 0,4463 \cdot F \cdot A \cdot c \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot \left(\frac{F \cdot D \cdot v}{R \cdot T} \right)^{\frac{1}{2}} \tag{2.30}$$

i dla temperatury T = 298 K przyjmuje postać

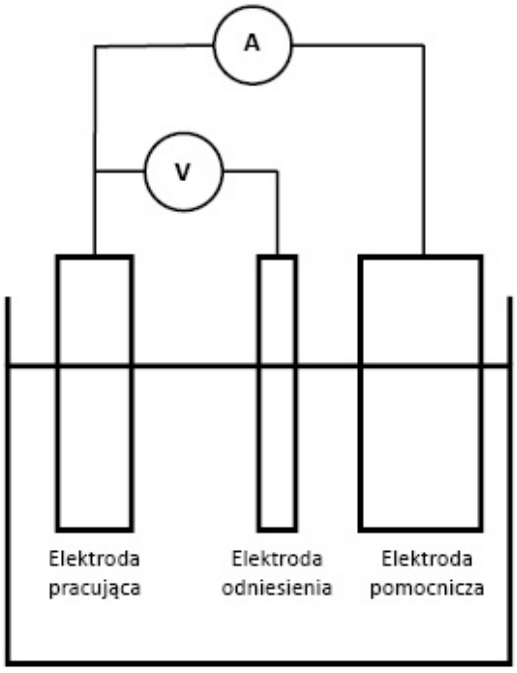
$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot A \cdot c \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot v^{\frac{1}{2}} \tag{2.31}$$

gdzie: n – liczba elektronów, A – powierzchnia elektrody [cm^2], c – stężenie [$mol \cdot cm^{-3}$], D – współczynnik dyfuzji [$cm^2 \cdot s^{-1}$], v – szybkość skanowania [$V \cdot s^{-1}$].

W przypadku procesu całkowicie odwracalnego iloraz wysokości pików prądu utlenienia i redukcji powinien być równy 1. Podczas

interpretacji woltamperogramów cyklicznych jest również istotne określenie różnicy potencjałów pików anodowego i katodowego, który w przypadku procesu jednoelektronowego powinien wynosić 59,2 mV [7, 11].

Należy jednak podkreślić ograniczoną czułość zarówno techniki CV, jak i LSV wynikającą z generowania prądu pojemnościowego na granicy faz elektroda–roztwór badany. Rozwiązaniem tego problemu okazało się wprowadzenie modulacji pulsowej, prostokątnej lub sinusoidalnej na liniowo zmieniający się potencjał. Eliminacja prądu pojemnościowego jest możliwa dzięki występowaniu różnic w szybkości spadku odpowiedzi prądowej, ponieważ prąd pojemnościowy maleje o wiele szybciej niż prąd faradajowski [12]. Inną grupą technik, umożliwiających poprawę granic oznaczalności, są techniki inwersyjne (strippingowe). Analizy przy ich użyciu składają się z dwóch etapów. Podczas pierwszego dochodzi do zatężenia analitu na powierzchni lub w objętości elektrody pracującej, po czym w wyniku zmiany potencjału następuje proces utlenienia bądź redukcji depolaryzatora obecnego na/w elektrodzie. W przypadku technik inwersyjnych były najczęściej wykorzystywane elektrody rtęciowe. Co istotne, przy wyborze elektrody jest uwzględniany nie tylko materiał elektrodowy, lecz także skład roztworu badanego. Obecnie do najpopularniejszych materiałów elektrodowych można zaliczyć metale (złoto, srebro, platyna) oraz materiały węglowe w postaci, np. elektrody z węgla szklistego czy diamentowej domieszkowanej borem [13].



RYS. 2.11

Schemat układu trójelektrodowego, który jest wykorzystywany w technikach amperometrii i woltamperometrycznych

2.2.3
Podstawy działania sensorów amperometrycznych i woltamperometrycznych

Amperometria i woltamperometria znalazły swoje zastosowanie w analizie przy użyciu sensorów i biosensorów, choć należy podkreślić, że w ostatnich latach są najczęściej wykorzystywane jako techniki detekcji w przypadku biosensorów. W takich rozwiązaniach są stosowane elektrody modyfikowane warstwami receptorowymi składającymi się z cząsteczek pochodzenia biologicznego, w tym białek,

przeciwciał czy kwasów nukleinowych. Więcej informacji na temat tych urządzeń można znaleźć w rozdziale poświęconym biosensorom. W przypadku układów sensorowych, które wykorzystują amperometrię i woltamperometrię, są używane elektrody modyfikowane warstwami pośrednimi. W tym przypadku do najczęściej wykorzystywanych materiałów można zaliczyć polimery takie jak poli(4-winylopirolidon) (PVP), poli(winyloferrocen) (PVF), poli(3,4-etyleno-1,4-dioksytiofen) (PEDOT) czy poli(4-nitrostyren) [8, 14]. Warstwa złożona z danego materiału jest tworzona przy użyciu techniki zanurzenia, wirowania, elektroosadzania, elektropolimeryzacji czy kowalencyjnego dowiązania. Zastosowanie modyfikowanych elektrod sprzyja poprawie ich selektywności przede wszystkim dzięki modulacji wartości potencjałów redoks wybranych analitów, co może ograniczyć nakładanie sygnałów prądowych pochodzących od różnych składników znajdujących się w badanej próbce. Wprowadzenie dodatkowej warstwy na powierzchnię elektrod przyczynia się do zmiany szybkości przenoszenia masy, a także może doprowadzić do akumulacji wybranego analitu przy powierzchni elektrody [8].

Sposoby generowania sygnału analitycznego

W przypadku zastosowania amperometrii i woltamperometrii są wyróżniane dwa sposoby generowania odpowiedzi prądowej, tzn. bezpośredni i pośredni. Bezpośrednie generowanie sygnału ma miejsce najczęściej w przypadku, gdy wykrywany analit wykazuje właściwości elektroaktywne, np. jony metali, czy proste związki organiczne, np. dopamina [15]. Akumulacja analitu na powierzchni elektrody na skutek

adsorpcji bądź związania z warstwą pośrednią sprzyja zwiększeniu intensywności odpowiedzi prądowej w określonym zakresie stężeń. Warstwa pośrednia utworzona na powierzchni elektrody może również wykazywać właściwości redoks, które ulegają modulacji w wyniku oddziaływania z analitem [16]. W takim przypadku zmiana sygnału prądowego może jednak być wynikiem nie tylko specyficznego wiązania z wybraną cząsteczką, lecz także niespecyficznego oddziaływania z interferentami występującymi w badanej próbce. W przypadku, gdy zarówno warstwa receptorowa, jak i sam analit nie wykazują aktywności redoks, do układu są wprowadzane tzw. znaczniki redoks, które mogą ulegać reakcjom utlenienia bądź redukcji przy określonej wartości lub zakresie potencjałów. Jest to tzw. pośredni rodzaj detekcji [17]. Stosowane w badaniach znaczniki są zazwyczaj obdarzone ładunkiem, co jest szczególnie użyteczne w przypadku stosowania warstw pośrednich na powierzchni elektrody. Wiązanie warstwy pośredniej z analitem może bowiem przyczynić się do zmiany wypadkowego ładunku na powierzchni elektrody, czego efektem jest silniejsze przyciąganie bądź odpychanie cząsteczek znacznika redoks do/od elektrody.

2.2.4
Przykłady zastosowań

Jednym z najbardziej znanych przykładów sensorów amperometrycznych jest tzw. elektroda Clarka, która jest wykorzystywana do oznaczania rozpuszczonego tlenu w roztworze [18, 19]. Przy odpowiedniej konstrukcji jest również możliwe wykrycie innych gazów o właściwościach utleniająco-redukujących np. NO, NO_2,

Cl_2. Standardowy układ jest złożony z elektrody chlorosrebrowej stanowiącej anodę oraz katody, którą tworzy elektroda platynowa bądź złota. Obie elektrody są zanurzone w roztworze elektrolitu i oddzielone od badanej próbki półprzepuszczalną membraną, która może być wykonana np. z teflonu czy polietylenu. Membrana jest przepuszczalna dla tlenu, a jednocześnie stanowi barierę dla innych składników próbki (także gazowych) oraz zanieczyszczeń. Podczas pomiaru amperometrycznego do elektrod przykładany jest stały potencjał, które wynosi zwykle 0,7–0,8 V względem elektrody chlorosrebrowej. Po przekroczeniu potencjału rozkładowego na elektrodach zachodzą następujące reakcje:

Ag/AgCl (anoda): $4Ag + 4Cl^- \rightarrow 4AgCl + 4e^-$ (2.32)

Pt (katoda): $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$ (2.33)

Na anodzie dochodzi do utlenienia srebra, które wchodzi w reakcję z anionami chlorkowymi, czego efektem jest powstanie trudno rozpuszczalnego chlorku srebra. Z kolei na katodzie dyfundujący przez membranę tlen ulega redukcji. W efekcie jest rejestrowany sygnał prądowy, który jest proporcjonalny do stężenia tlenu w elektrolicie lub jego ciśnienia cząstkowego. Elektroda Clarka znalazła zastosowanie w konstrukcji biosensorów, w tym m.in. historycznie pierwszych biosensorów do oznaczania glukozy.

Do najpopularniejszych analitów oznaczanych z użyciem technik amperometrii i woltamperometrii zaliczane są cząsteczki neuroprzekaźników, takich jak: dopamina, epinefryna czy serotonina. Na przestrzeni kilkudziesięciu lat zostało opracowanych wiele rozwiązań, np. w postaci modyfikacji elektrod nanomateriałami, takimi jak nanorurki węglowe, pochodne grafenu, polimery, nanocząstki

metali, lub nieorganicznymi modyfikatorami. Miało to służyć jednoczesnemu oznaczeniu tych cząsteczek z uwagi na fakt, że charakteryzują się one zbliżonym potencjałem utlenienia, czego efektem jest nakładanie sygnałów prądowych uniemożliwiających identyfikację poszczególnych związków [20–22].

Innym przykładem analitu wykrywanego z użyciem czujników amperometrycznych jest kwas askorbinowy, który pełni istotną funkcję w metabolizmie, syntezie kolagenu i tworzeniu naczyń krwionośnych oraz kości, jest także stosowany jako przeciwutleniacz i środek przeciwzapalny. Kwas askorbinowy może być oznaczany z użyciem technik prądowych, jednak na powierzchni niemodyfikowanych elektrod dochodzi do jego nieodwracalnego utlenienia, a powstały produkt kwas 2,3-diketoglukonowy ulega adsorpcji na powierzchni, co powoduje zablokowanie powierzchni elektrody i przesunięcie potencjału sygnału utlenienia kwasu askorbinowego oraz pogorszenie intensywności uzyskanej odpowiedzi prądowej. Dodatkowo kwas askorbinowy wyróżnia się potencjałem utlenienia zbliżonym m.in. do kwasu moczowego i dopaminy, co może powodować występowanie interferencji. Jedną z możliwości ograniczenia tego zjawiska była modyfikacja powierzchni elektrody z węgla szklistego za pomocą kompozytu złożonego z nanocząstek palladu i tlenku grafenu, co zapewniło wydajniejszy transport elektronów do powierzchni elektrody i przesunięcie potencjału utlenienia kwasu askorbinowego w kierunku ujemnym. Należy podkreślić, że przedstawiony sensor jest tylko jednym z opisanych przykładów oznaczenia kwasu askorbinowego z wykorzystaniem modyfikowanych elektrod, a liczba publikacji dotycząca tego tematu cały czas rośnie [23].

Modyfikacja powierzchni elektrod umożliwia przesunięcie wartości potencjałów redoks poszczególnych składników badanej próbki na

skutek zmiany stałych szybkości transportu elektronów oraz poprawę czułości dzięki rozwinięciu powierzchni elektrochemicznej elektrody. Korzystnym zjawiskiem jest również możliwość akumulacji wybranego analitu dzięki selektywnemu oddziaływaniu z warstwą utworzoną na powierzchni elektrody. Przykładem może być zastosowanie pochodnych kwasu fenyloboronowego do modyfikacji powierzchni złotych elektrod dyskowych, których następnie użyto do oznaczenia cząsteczek fruktozy i anionów fluorkowych. Oddziaływanie z fruktozą przy pH 9,0 doprowadziło do konwersji kwasu boronowego (kwasu 4-merkaptofenyloboronowego (MPBA) lub kwasu 4-aminofenyloboronowego (APBA)) do estru o niższym pK_a, co zwiększyło z kolei jego powinowactwo do jonów hydroksylowych. W efekcie wzmocnieniu uległo odpychanie cząsteczek znacznika redoks – pary heksacyjanożelazianów(II)/(III) potasu o ujemnym ładunku od powierzchni elektrody i zwiększenie oporu przeniesienia ładunku (R_{ct}) wraz ze wzrostem stężenia fruktozy [24]. Należy podkreślić, że zdecydowana większość obecnie opracowywanych sensorów amperometrycznych i woltamperometrycznych wykorzystuje warstwy receptorowe pochodzenia biologicznego i informacje dotyczące takich urządzeń znajdują się w części monografii dotyczącej biosensorów.

2.3
Sensory potencjometryczne w warunkach elektrochemicznych

technik prądowych

Agata MICHALSKA, Krzysztof MAKSYMIUK

Sensory potencjometryczne, a w szczególności elektrody jonoselektywne, należą do grupy czujników elektrochemicznych pracujących z reguły w warunkach bezprądowych, charakteryzujących się dużą selektywnością i stabilnością sygnału potencjałowego [25, 26]. Do ich istotnych zalet należy też prostota obsługi i nieskomplikowana aparatura pomiarowa sprowadzająca się zwykle do miernika napięcia o dużej oporności wejściowej. Jednak z tą prostotą pomiaru są też związane istotne ograniczenia, wynikające przede wszystkim z tego, że nie można w łatwy sposób wpływać na parametry analityczne czujnika, co jest rutyną w innych technikach elektrochemicznych poprzez dobór warunków pomiarowych (np. w woltamperometrii jest to zakres potencjałów lub szybkość zmiany potencjału). Z tego punktu widzenia istotnym ograniczeniem potencjometrii jest czułość pomiaru, tj. nachylenie zależności mierzonego potencjału od logarytmu z aktywności jonów w roztworze, które jest określone przez równanie Nernsta (równanie Nikolskiego lub Nikolskiego–Eisenmana). Poza tym, samo oznaczenie może dotyczyć tylko jednego rodzaju jonów dla określonej elektrody, a obniżenie granicy wykrywalności można uzyskać w dość skomplikowany sposób, np. przez zmianę roztworu wewnętrznego lub zmianę procedury kondycjonowania. Ograniczenia dotyczą też selektywności, którą można w istotny sposób zmienić dopiero w wyniku zmiany składu membrany jonoselektywnej.

Skutecznym środkiem zaradczym dla przezwyciężenia tych ograniczeń jest zastosowanie w stosunku do sensorów

potencjometrycznych typowych elektrochemicznych metod prądowych. Dodatkowo, wykorzystanie takich metod umożliwiło wprowadzenie prostych testów diagnostycznych sensorów oraz umożliwiło badanie pewnych elementów mechanizmu funkcjonowania wspomnianych czujników.

Należy jednak pamiętać, że sensory potencjometryczne, w tym elektrody jonoselektywne, były konstruowane i optymalizowane z punktu widzenia zastosowań w analizie potencjometrycznej, czyli w pomiarach, którym nie towarzyszy przepływ prądu. Z tego powodu, konstruując elektrody, nie traktowano znacznej oporności omowej sensora jako problemu, z reguły oporność ta, wynikająca przede wszystkim z obecności membrany jonoselektywnej, jest bardzo duża, rzędu kΩ lub MΩ. Jednak nawet tak niskie przewodnictwo nie stanowi istotnej przeszkody w pomiarze napięcia przy wykorzystaniu urządzeń o wysokiej oporności wejściowej.

Pod koniec XX wieku, a zwłaszcza na początku XXI wieku pojawiło się wiele prac wskazujących nowe kierunki rozwoju elektrod jonoselektywnych. Badania te dotyczyły też mechanizmu pracy takich sensorów i potwierdziły, że o mierzonym potencjale, jego zależności od aktywności jonów i od czasu decyduje nie tylko równowaga dotycząca wymiany jonowej, lecz także zjawiska o charakterze dynamicznym, przede wszystkim transport jonów przez granicę faz membrana jonoselektywna/roztwór, a także wewnątrz membrany. Duże podobieństwo natury procesów zachodzących w elektrodach jonoselektywnych i typowych procesów elektrochemicznych skłoniło do wniosku, że sposobem zwiększenia możliwości analitycznych, a także poszerzenia możliwości badań elektrod jonoselektywnych, może być zastosowanie typowych elektrochemicznych technik prądowych. Jednak ze względu na dużą oporność czujników nie było to zadanie łatwe,

dlatego istotny postęp w tej dziedzinie przyniosły dopiero pierwsze dwie dekady XXI wieku.

2.3.1 Wykorzystanie chronopotencjometrii

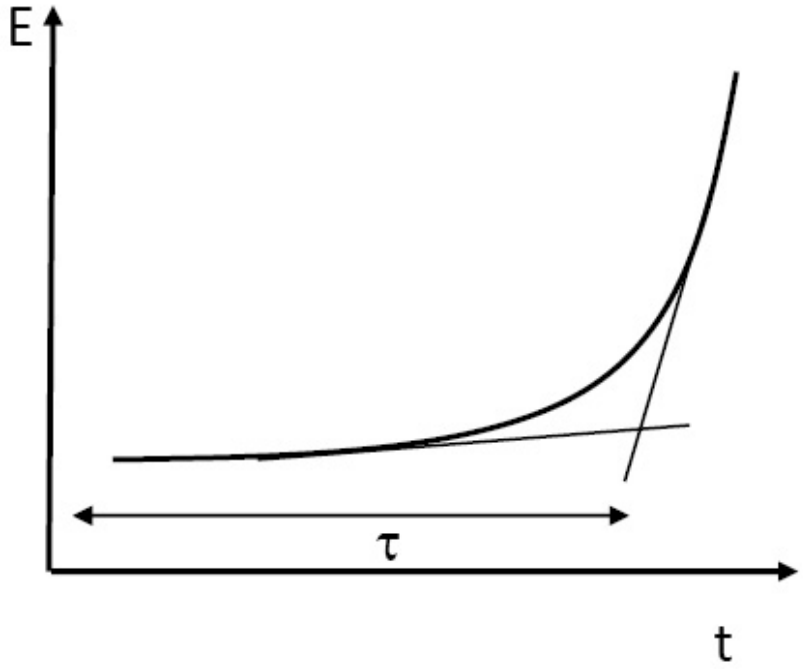
Jedną z częściej stosowanych i jeszcze 10–20 lat temu najpopularniejszą techniką elektrochemiczną stosowaną w odniesieniu do elektrod jonoselektywnych była i jest polaryzacja galwanostatyczna, chronopotencjometria. W metodzie tej rejestruje się zależność potencjału elektrody od czasu w warunkach stałego natężenia prądu.

W klasycznej chronopotencjometrii, z wykorzystaniem elektrod metalicznych i elektroaktywnego reagenta w roztworze, charakterystyczną wielkością dla tej zależności jest czas przejścia, czyli czas, dla którego rejestruje się gwałtowny wzrost lub spadek potencjału, związany z wyczerpaniem reagenta w przyelektrodowej warstwie dyfuzyjnej (rys. 2.12). W warunkach dyfuzji liniowej jako procesu ograniczającego szybkość procesu, pierwiastek kwadratowy z czasu przejścia, τ, jest proporcjonalny do stężenia reagenta w głębi roztworu, c, co znalazło zastosowanie analityczne. Wspomnianą zależność opisuje równanie Sanda:

$$\tau^{\frac{1}{2}} = \frac{nFAcD^{\frac{1}{2}}p^{\frac{1}{2}}}{2I} \qquad (2.34)$$

gdzie: A – powierzchnia elektrody, D – współczynnik dyfuzji formy docierającej do powierzchni elektrody, I – natężenie prądu, n – liczba

wymienianych elektronów w reakcji, *F* – stała Faradaya.



RYS. 2.12

Schematyczny przebieg krzywej chronopotencjometrycznej dla reagenta w roztworze, ulegającego reakcji utleniania na powierzchni typowej elektrody metalicznej

W latach 50. i 60. XX wieku chronopotencjometria była dość popularną techniką pomiarową, m.in. ze względu na prostotę stosowanej aparatury. Wprawdzie w późniejszych latach dużo chętniej wykorzystywano metody woltamperometryczne, jednak na początku XXI wieku nastąpił ponowny wzrost zainteresowania chronopotencjometrią, tym razem wykorzystywanej w pomiarach z udziałem elektrod jonoselektywnych. To zwiększenie roli chronopotencjometrii, właśnie w odniesieniu do sensorów stosowanych zwykle w warunkach potencjometrycznych, może wynikać z dwóch powodów. Po pierwsze, stosując chronopotencjometrię łatwiej jest wyeliminować niepożądany efekt oporności omowej. Oporność ta,

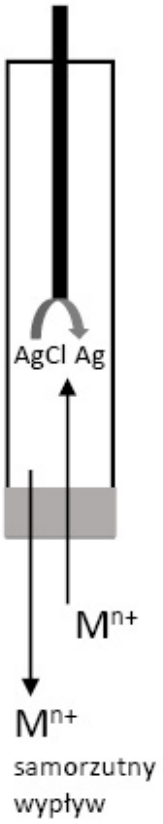
inaczej niż w warunkach woltamperometrycznych, często nie powoduje deformacji rejestrowanej krzywej chronopotencjometrycznej, a jedynie jej przesunięcie wzdłuż osi potencjału. Po drugie, rejestrowanym sygnałem jest potencjał, dlatego łatwiej jest ocenić wpływ polaryzacji w porównaniu z warunkami bezprądowymi, charakterystycznymi dla typowych zastosowań elektrod jonoselektywnych.

Wśród zastosowań chronopotencjometrii w dziedzinie elektrod jonoselektywnych można wyróżnić trzy zasadnicze kierunki. Pierwszy dotyczy rejestrowania typowej charakterystyki potencjometrycznej – zależności potencjału od logarytmu aktywności jonów analitu, ale w warunkach polaryzacji galwanostatycznej. Drugi kierunek dotyczy bezpośredniego zastosowania chronopotencjometrii jako metody analitycznej, z wykorzystaniem zależności czasu przejścia od stężenia analitu (równanie 2.34). Trzeci kierunek nie dotyczy już bezpośrednich zastosowań analitycznych, lecz badania natury zachodzących procesów i diagnostyki elektrod jonoselektywnych.

Pierwsze prace w tej dziedzinie dotyczyły wpływu polaryzacji na charakterystykę potencjometryczną i wpływu takiej polaryzacji na obniżenie granicy wykrywalności. W przypadku typowego pomiaru potencjału elektrody jonoselektywnej, czyli w warunkach obwodu otwartego, przyczyną podwyższonej granicy wykrywalności jest zwykle samorzutny wypływ jonów (np. kationów) z roztworu wewnętrznego elektrody, przez membranę, do roztworu próbki, wywołany gradientem stężeń między roztworem wewnętrznym a próbką – stężenie tych jonów w roztworze wewnętrznym jest zwykle dużo większe niż w próbce o małym stężeniu analitu.

Narzucenie odpowiedniego prądu katodowego może zniwelować wspomniany efekt w przypadku elektrody czułej na kationy. Jeżeli zastosuje się typową elektrodę z roztworem wewnętrznym, przepływ

prądu katodowego powoduje redukcję materiału wewnętrznej elektrody odniesienia, czyli przekształcanie chlorku srebra tej elektrody w metaliczne srebro (rys. 2.13). Pojawiający się ładunek ujemny, pochodzący od uwalnianych jonów chlorkowych, jest w tej sytuacji kompensowany przez kationy pochodzące z roztworu próbki, przemieszczające się przez membranę kationoselektywną (zawierającą zwykle jonofor wiążący się selektywnie z kationami analitu) i docierające do roztworu wewnętrznego. W rezultacie przepływ prądu wymusza przepływ kationów do membrany i kompensuje ich samorzutny wypływ, co prowadzi do obniżenia granicy wykrywalności [27].



RYS. 2.13

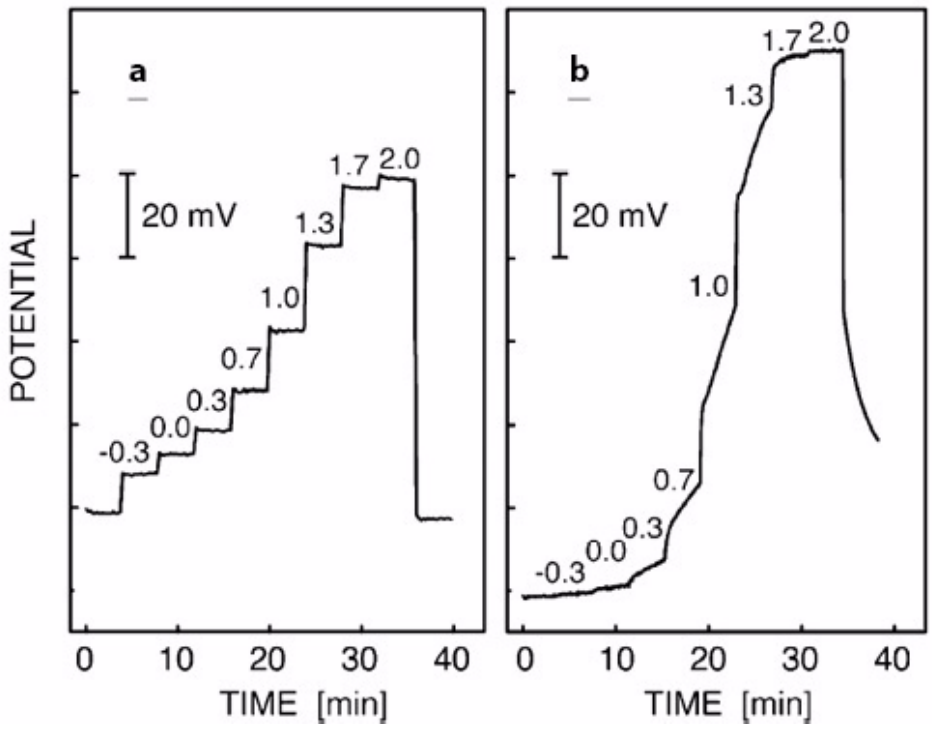
Schematyczny obraz elektrody kationoselektywnej w warunkach katodowej polaryzacji galwanostatycznej z kompensacją samorzutnego wypływu kationów

W zoptymalizowanych warunkach następuje znaczne obniżenie granicy wykrywalności (o dwa–trzy rzędy wielkości w stosunku do warunków bezprądowych). Jednak istotnym problemem jest tu konieczność starannego doboru wartości narzuconego prądu. Zbyt niska wartość prądu katodowego nie spowoduje istotnej poprawy, natomiast zbyt wysoka wartość doprowadzi do odwrócenia kierunku przepływu jonów. Przy narzuceniu dość wysokiego prądu katodowego będzie wymuszany przepływ kationów do membrany, w rezultacie, dla niskiego stężenia analitu w roztworze, stężenie przy powierzchni elektrody może obniżyć się w porównaniu ze stężeniem w głębi roztworu. Takie obniżenie stężenia spowoduje dodatkowy spadek potencjału elektrody i odchylenie od liniowej zależności potencjału od logarytmu aktywności jonów w głębi roztworu. Pojawi się tzw. efekt ponadnernstowski, czyli przypadek, dla którego zależność potencjału od logarytmu aktywności w przybliżeniu liniowym daje nachylenia większe od nernstowskiego.

Innym mankamentem opisanej metody może być zmienność potencjału w czasie pomiaru w zakresie niskich stężeń, wynikająca z postępującej polaryzacji stężeniowej w warstwie przyelektrodowej.

Korzystniejsze efekty przyniosło zastosowanie polaryzacji w postaci impulsów prądowych. Metoda ta okazała się szczególnie pomocna przy oznaczaniu stężeń jonów organicznych (np. oligopeptydów) o dużym ładunku elektrycznym, w tym surfaktantów [28, 29]. Przykładami takich analitów mogą być heparyna i protamina, których obecność ma znaczenie dla procesów krzepnięcia krwi. Z równania Nernsta (lub równania Nikolskiego) wynika, że dla jonów o dużym ładunku nachylenie zależności potencjału (w warunkach równowagowych) od logarytmu stężenia jest bardzo małe, czyli elektrody jonoselektywne w takim przypadku wydają się nieprzydatne. Jednak w rzeczywistości

nachylenie takiej zależności jest dość duże, ponieważ jony organiczne (o dużej lipofilowości) wykazują znaczne powinowactwo do organicznego środowiska membrany. W rezultacie, zachodzi w tym przypadku proces nieodwracalnej ekstrakcji jonowego analitu prowadzący m.in. do tego, że krzywa zależności potencjału od logarytmu stężenia wykazuje wprawdzie duże nachylenie, ale też zmienia się w czasie. W tej sytuacji pomocna okazała się pulsowa polaryzacja prądowa, w sposób kontrolowany wymuszająca określony przepływ jonów, zapewniająca w rezultacie stabilną w czasie charakterystykę analityczną o dużym nachyleniu (rys. 2.14).



RYS. 2.14

Zależność potencjału od stężenia protaminy zarejestrowana (A) w obecności pulsowej polaryzacji galwanostatycznej i (B) w warunkach obwodu otwartego [28]. Przedrukowano za zgodą © 2003 American Chemical Society

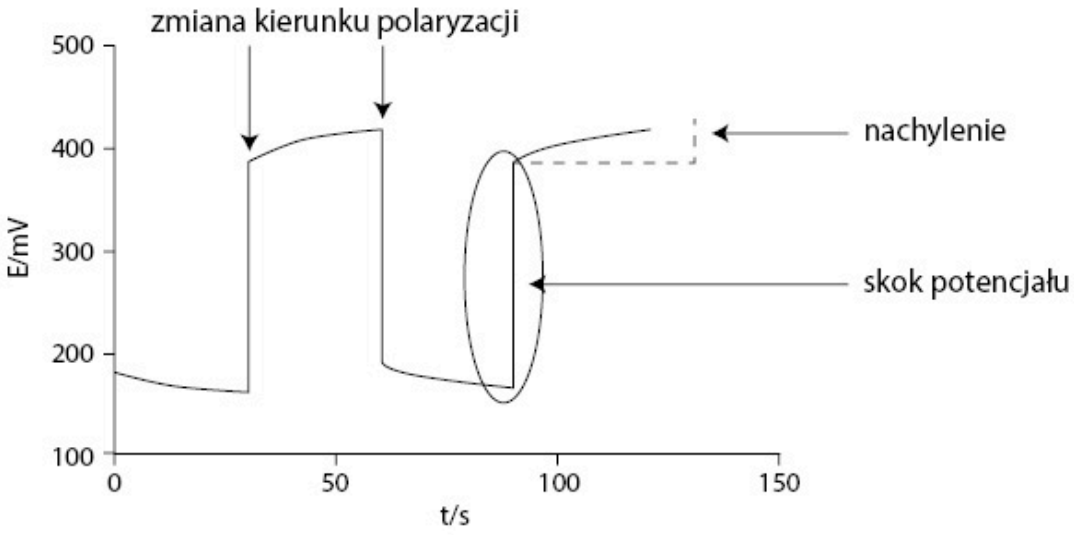
Jak pokazano na rys. 2.14, w warunkach obwodu otwartego zależność sygnału potencjałowego od dodatku analitu nie jest liniowa. Dla małych stężeń zmiany są niewielkie, ale dla kolejnych dodatków następuje skokowy wzrost potencjału, który dodatkowo rośnie w miarę upływu czasu. Natomiast w warunkach chronopotencjometrii pulsowej uzyskuje się niemal liniową zależność od dodatku analitu, poza tym potencjał przy określonym stężeniu analitu jest stały.

Drugi kierunek zastosowań chronopotencjometrii odwołuje się do bezpośredniego analitycznego wykorzystania tej metody. Przy zastosowaniu stałego prądu, w obecności transportu dyfuzyjnego reagenta do powierzchni elektrody, stopniowo następuje spadek stężenia reagenta w pobliżu powierzchni elektrody aż do osiągnięcia wartości praktycznie zerowej. Prowadzi to do gwałtownej zmiany potencjału, czyli jest osiągany czas przejścia, analogicznie jak dla klasycznej chronopotencjometrii (równanie 2.34).

Bakker i współpracownicy zaproponowali zastosowanie chronopotencjometrii w odniesieniu do elektrod jonoselektywnych, w celu oznaczania różnych analitów nieelektroaktywnych (czyli inaczej niż w klasycznej chronopotencjometrii, gdzie wymagane było zachodzenie reakcji elektrodowej dla analitu). Jednym z przykładów może być oznaczanie słabych kwasów [30], z wykorzystaniem elektrody jonoselektywnej czułej na jony wodorowe (z typową membraną polimerową). W trakcie polaryzacji katodowej jony wodorowe, pochodzące z dysocjacji kwasu, są inkorporowane do membrany. W wyniku zużycia kwasu i jego powolnego transportu dyfuzyjnego z głębi roztworu, w miarę upływu czasu pogłębia się efekt polaryzacji stężeniowej. Po wyczerpaniu analitu przy powierzchni elektrody następuje typowy w takiej sytuacji skok potencjału. W rezultacie można uzyskać liniową zależność pierwiastka z czasu

przejścia od stężenia słabego kwasu, zgodnie z równaniem Sanda (równanie 2.34).

Trzeci obszar zastosowań to diagnostyka elektrod jonoselektywnych. Należy tutaj wymienić przede wszystkim metodę zaproponowaną przez Bobacka [31]. Polaryzując elektrodę jonoselektywną naprzemiennie, przy użyciu prądu anodowego i katodowego o małej wartości (zwykle rzędu nA), uzyskuje się zależność przedstawioną schematycznie na rys. 2.15. Skok potencjału towarzyszący zmianie kierunku polaryzacji wyraża omowy spadek potencjału. Na podstawie tego skoku, znając natężenie prądu, można wyznaczyć oporność membrany jonoselektywnej. Z kolei, liniowy charakter zależności potencjału od czasu w trakcie polaryzacji anodowej lub katodowej wskazuje na charakterystykę pojemnościową elektrody, określoną np. przez pojemność stałego kontaktu umieszczonego pomiędzy membraną a podłożem elektrodowym, a zastępującego roztwór wewnętrzny w elektrodzie jonoselektywnej klasycznej konstrukcji. Pojemność ta decyduje o stabilności potencjału rejestrowanego w warunkach obwodu otwartego. W rezultacie, krótki pomiar chronopotencjometryczny (trwający najwyżej kilka minut) może dostarczyć informacji zarówno o oporności membrany, jak i o pojemności decydującej o stabilności potencjału elektrody, zastępując typową długotrwałą (wielogodzinną lub wielodniową) procedurę pomiaru zależności potencjału od czasu w warunkach obwodu otwartego. Stąd, w krótkim czasie można wyciągnąć wniosek o tym, czy charakterystyka sensora będzie stabilna.



RYS. 2.15

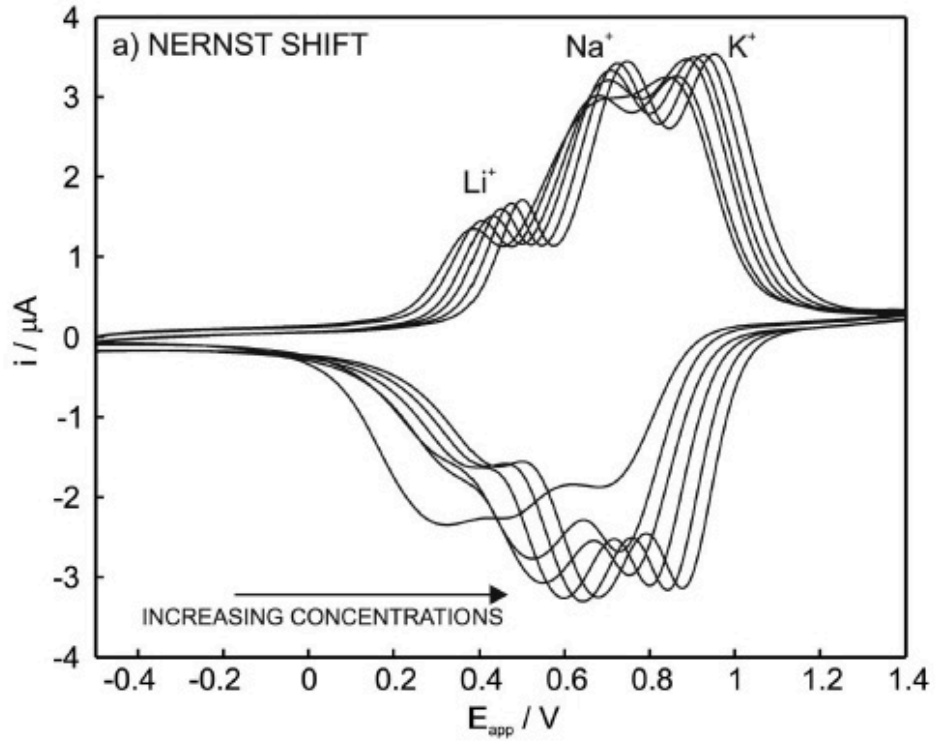
Przykładowy przebieg katodowo-anodowej krzywej chronopotencjometrycznej dla elektrody jonoselektywnej (C: pojemność, I: prąd, R: oporność)

2.3.2 Wykorzystanie metod woltamperometrycznych

Jak wspomniano wcześniej, metody woltamperometryczne mają ograniczone zastosowanie w odniesieniu do elektrod jonoselektywnych ze względu na wysoką oporność membran i wynikającą stąd deformację rejestrowanych krzywych. Jednak mimo tych problemów, technika ta jest ostatnio z powodzeniem wykorzystywana przez różne grupy badawcze, m.in. w grupie Amemiya [32, 33]. Podstawowym warunkiem jest zastosowanie stosunkowo cienkich membran o niezbyt

dużej oporności, przy nakładaniu membran szczególnie przydatna okazała się metoda *spin coating*, czyli nakładania roztworu składników membrany na wirującą powierzchnię. Wymienieni autorzy rozwijali przede wszystkim metodę woltamperometrii inwersyjnej. W pierwszym etapie (zatężania) wprowadzali do membrany jony analitu, np. jony ClO_4^- po przyłożeniu potencjału dodatniego, wymuszającego utlenianie polimeru przewodzącego – poli(oktylotiofenu) [32]. Następnie po narzuceniu odpowiedniego potencjału ujemnego następowało uwalnianie nagromadzonych jonów z membrany, a rejestrowany prąd piku informował o zawartości analitu. Uzyskano w ten sposób niskie granice wykrywalności, np. dla wspomnianych jonów chloranowych(VII) granica wykrywalności wynosiła około 0,2–0,5 nmol/dm^3.

Badania takie rozwijali później Crespo i Cuartero ze współpracownikami [34]. Wykorzystując metodę woltamperometryczną i membranę jonoselektywną z odpowiednimi jonoforami, można w selektywny sposób oznaczać występujące obok siebie kationy, np. litowców (rys. 2.16).



RYS. 2.16

Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane dla elektrod jonoselektywnych z jonoforami selektywnymi dla jonów Li^+, Na^+ i K^+, dla różnych stężeń w zakresie od $3{,}16 \cdot 10^{-5}$ do $1 \cdot 10^{-2}$ mol/dm^3 [34]. Przedrukowano za zgodą © 2016 American Chemical Society

Należy zaznaczyć, że liniową zależność prądu piku od stężenia uzyskuje się tylko dla dość niskich stężeń analitu w roztworze próbki, ponieważ wtedy transport jonów w roztworze staje się czynnikiem ograniczającym szybkość całego procesu. Jednak dla wyższych stężeń analitu o szybkości procesu decydują zjawiska zachodzące w membranie, np. transport jonów w membranie. Szybkość takich procesów nie zależy od stężenia jonów analitu w roztworze, dlatego zanika też zależność prądu piku od stężenia. Z drugiej strony, ponieważ równowaga wymiany jonowej na granicy faz membrana/roztwór jest włączona w ciąg zachodzących przemian, położenie piku prądowego

jest skorelowane z wartością potencjału membranowego. W rezultacie położenie piku na osi potencjału będzie w sposób nernstowski zależeć liniowo od logarytmu stężenia (aktywności) analitu (jak na rys. 2.16).

2.3.3
Wykorzystanie metod kulometrycznych

W odniesieniu do elektrod jonoselektywnych są też stosowane metody kulometryczne, zwłaszcza miareczkowanie kulometryczne. W klasycznej wersji miareczkowanie kulometryczne polega na elektrolitycznym generowaniu odczynnika reagującego z analitem, zastępującym dodawanie titranta z biurety. Jednak metoda ta ograniczona jest tylko do „titrantów", które mogą być produktem reakcji elektrodowej – produktem głównym (np. jony srebra wytwarzane w wyniku utleniania metalicznego srebra), bądź ubocznym (jony wodorotlenkowe powstające w reakcji wydzielania wodoru z wody).

Możliwości miareczkowania kulometrycznego poszerzają się o wytwarzanie titrantów niebędących produktami reakcji elektrodowych, gdy odczynnik miareczkujący generowany jest z wykorzystaniem elektrody jonoselektywnej. W pracy [35] Bakker i współpracownicy zaproponowali procedurę miareczkowania jonami wapnia, uwalnianymi w wyniku polaryzacji anodowej wapniowej elektrody jonoselektywnej, wysyconej jonami wapnia. Uzyskano liniową zależność ilości uwalnianych jonów wapnia od ładunku, metodę tę z powodzeniem wykorzystano do oznaczania EDTA w roztworze.

Inne i proste konstrukcyjnie rozwiązanie zaproponowali Bobacka i współpracownicy [36], metoda polega na wykorzystaniu elektrod

jonoselektywnych, dla których sygnał potencjałowy został zastąpiony przez pomiar ładunku. Autorzy zastosowali elektrodę jonoselektywną ze stałym kontaktem z polimeru przewodzącego, do której przykładano określony potencjał (względem elektrody odniesienia). Zmiana stężenia jonów analitu zmieniała potencjał równowagowy elektrody i w rezultacie zmieniała się wartość przyłożonego nadpotencjału (jako różnicy między przyłożonym potencjałem równym stałemu potencjałowi elektrody i potencjału równowagowego). W wyniku tego przepływał ładunek utleniania lub redukcji polimeru przewodzącego – stałego kontaktu. Dzięki stałej wartości pojemności stałego kontaktu z polimeru przewodzącego, ładunek ten jest proporcjonalny do zmiany potencjału (istniejącego nadpotencjału) i w konsekwencji zależy liniowo (poprzez równanie Nernsta lub równanie Nikolskiego) od logarytmu aktywności jonów analitu w próbce. Dobierając ilość materiału stałego kontaktu, można wpływać na jego pojemność i w rezultacie wartość ładunku odpowiadającą określonej zmianie potencjału. W ten sposób można zmieniać/zwiększać czułość metody. Dzięki temu metodę tę można wykorzystać do rejestracji niewielkich zmian stężenia analitu, gdzie typowy pomiar potencjometryczny nie daje zadowalających rezultatów ze względu na zbyt małą czułość.

2.3.4
Wykorzystanie metod z rejestracją sygnału optycznego

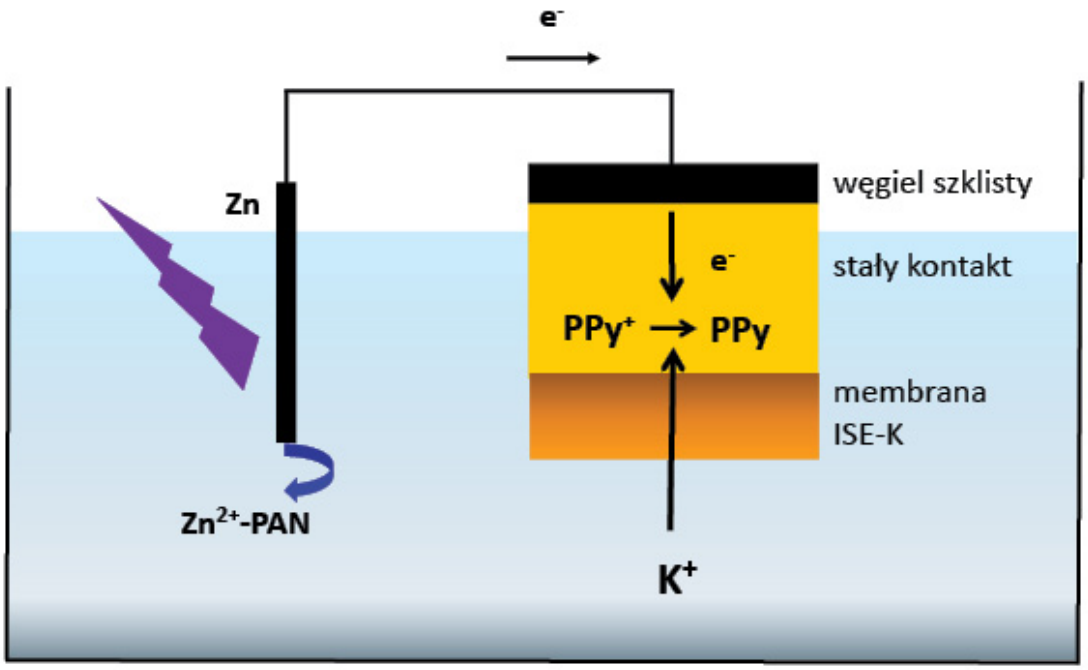
Oprócz opisanych wyżej najpopularniejszych sposobów wykorzystania prądowych metod elektrochemicznych w odniesieniu do elektrod jonoselektywnych, zaproponowano też inne rozwiązania.

W ostatnich latach pojawiły się prace oferujące alternatywny sposób rejestracji sygnału. Zamiast sygnału elektrycznego (potencjałowego, prądowego lub ładunku) rejestruje się sygnały optyczne. W układach takich elementem jonoczułym jest elektroda jonoselektywna, której odpowiedź jest przetwarzana na sygnał optyczny (zmianę absorbancji lub natężenia luminescencji/fluorescencji). Taki sposób przekazywania informacji analitycznych może być korzystniejszy niż w przypadku sygnałów elektrycznych. Sygnał optyczny jest mniej podatny na zakłócenia, w pewnych sytuacjach może być po prostu zauważony jako zmiana barwy (nie wymaga stosowania aparatury pomiarowej), obecnie są też dostępne metody umożliwiające łatwą rejestrację sygnałów optycznych za pomocą kamery telefonu komórkowego i przesyłania zarejestrowanych danych. Omówimy tu dwa przykłady takich rozwiązań.

W pierwszym przypadku zastosowano typowy układ trójelektrodowy i potencjostat [37]. Szczególną cechą tego układu było wykorzystanie elektrody jonoselektywnej jako „elektrody odniesienia". Elektrodą pracującą była elektroda, na której w określonym zakresie potencjału potencjale generowano luminescencję. Do elektrody pracującej przyłożono stały potencjał względem „elektrody odniesienia". Zmiana stężenia analitu powodowała zmianę potencjału elektrody jonoselektywnej („elektrody odniesienia"), czyli prowadziła również do takiej samej zmiany potencjału elektrody pracującej. W wyniku tego zachodził proces elektrochemiczny związany z generowaniem luminescencji, skorelowany ze zmianą potencjału elektrody jonoselektywnej i w rezultacie zmianą logarytmu aktywności analitu.

Drugie rozwiązanie to układ działający samorzutnie, bez konieczności stosowania aparatury elektrochemicznej, pokazany na rys.

2.17 [38]. Wykorzystane zostały tutaj dwie elektrody: drut cynkowy i elektroda jonoselektywna (czuła na jony potasu jako modelowy analit, ISE-K). Dzięki odpowiedniej sekwencji potencjałów redoks po zanurzeniu obu elektrod w roztworze próbki zachodził samorzutny proces utleniania cynku do jonów Zn^{2+} i redukcji stałego kontaktu elektrody jonoselektywnej, połączonej z inkorporacją jonów potasu do membrany i dalej do warstwy stałego kontaktu (polipirolu). Ładunek redukcji polipirolu jest w tym przypadku równy ładunkowi utleniania cynku. Pojemność stałego kontaktu (jak w omówionej wcześniej metodzie kulometrycznej) była stała, więc ładunek redukcji polimeru przewodzącego był proporcjonalny do zmiany potencjału membranowego i w rezultacie do logarytmu aktywności jonów analitu (potasu). Z kolei ten ładunek był liniowo związany ze stężeniem wygenerowanych jonów cynku. Stężenie jonów cynku można było oznaczyć fluorymetrycznie, w rezultacie sygnał optyczny (fluorymetryczny) był proporcjonalny do logarytmu aktywności jonów potasu.



RYS. 2.17

Schemat działania układu elektrochemiczno-optycznego, z elektrodą jonoselektywną czułą na jony potasu i generacją sygnału fluorymetrycznego zależnego liniowo od logarytmu aktywności jonów potasowych, opisanego w [38]

2.3.5 Perspektywy zastosowań

Opisane w tym rozdziale elektrody jonoselektywne pracujące w warunkach polaryzacji prądowej wprawdzie nie doczekały się jeszcze zastosowań praktycznych w rutynowej analizie chemicznej, jednak stanowią obecnie jeden z wiodących tematów w dziedzinie sensorów elektrochemicznych. Badania są prowadzone w wielu ośrodkach naukowych na świecie i na kilku uczelniach w Polsce. Wdrożenie takich sensorów wymaga jeszcze zwiększenia niezawodności pracy, zmniejszenia wrażliwości na warunki eksperymentalne, ułatwienia obsługi i w miarę możności uproszczenia wymaganej aparatury. Z tego punktu widzenia szczególnie obiecujące wydają się czujniki generujące sygnał optyczny, łatwy do oceny wizualnej lub do zarejestrowania za pomocą urządzeń mobilnych, np. smartfonu.

Literatura

1. Generalic E., https://glossary.periodni.com/glossary.php?en=silver%2Fsilver-chloride+electrode (dostęp: 30.12.2020).
2. Generalic E., https://glossary.periodni.com/glossary.php?en=indicator+electrode (dostęp: 30.12.2020).

3. Mikhelson K.N., „Ion-Selective Electrodes", Lecture Notes in Chemistry 81*,* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2013.

4. Miyake M., Chen L.D., Pozzi G., Bühlmann P., „Ion-Selective Electrodes with Unusual Response Functions: Simultaneous Formation of Ionophore–Primary Ion Complexes with Different Stoichiometries", *Anal. Chem.*, 2021, **2**, 1104–1111.

5. Ceresa A., Sokalski T., Pretsch E., „Influence of key parameters on the lower detection limit and response function of solvent polymeric membrane ion-selective electrodes", *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **1–2**, 70–76.

6. Lindner E., Buck R.P., „Microfabricated Potentiometric Electrodes and Their In Vivo Applications", *Anal. Chem.*, 2000, **8**, 336 A–345 A.

7. Bard A.J., Faulkner L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, Hoboken 2001, 1–44, 226–261.

8. Janata J., *Principles of Chemical Sensors*, Springer, Berlin 2009, 201–239.

9. De Vries W.T., van Dalen E., „Linear potential-sweep voltammetry at a plane mercury-film electrode", *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 1967, **14**, 315–327.

10. Evans D.H., O'Connell K.M., Petersen R.A., Kelly M.J., „Cyclic voltammetry", *Cyclic Voltammetry Journal of Chemical Education*, 1983, **60**, 290–293.

11. Wang J., *Analytical Electrochemistry*, John Wiley & Sons, Hoboken 2000, 28–32.

12. Skoog D.A., West D.M., Holle F.J., *Podstawy chemii analitycznej*, tom 2, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007, 173–213.

13. Fujishima A., Rao T.N., Popa E., Sarada B.V., Yagi I., Tryk D.A., „Electroanalysis of dopamine and NADH at conducting diamond electrodes", *J. Electroanal. Chem.*, 1999, **473**, 179–185.

14. Lange U., Roznyatovskaya N.V., Mirsky V.M., „Conducting polymers in chemical sensors and arrays", *Anal. Chim. Acta*, 2008, **614**, 1–26.

15. Dhanjai, Sinha A., Lu X., Wu L., Tan D., Li Y., Chen J., Jain R., „Voltammetric Sensing of Biomolecules at Carbon Based Electrode Interfaces: A Review", *TRAC-Trend. Anal. Chem.*,2018, **98**, 174–189.

16. Amatore C., Maisonhaute E., Nierengarten J.-F., Chöllhorn B., „Direct Monitoring of Ultrafast Redox Commutation at the Nanosecond and Nanometer Scales by

Ultrafast Voltammetry: From Molecular Wires to Cation Releasing Systems", *Isr. J. Chem.*, 2008, **48**, 203–21.

17. Ksenzhek O.S., Petrova S.A., Kolodyazhny M.V., „Electrochemical properties of some redox indicators", *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1977, **4**, 346–357.
18. Mendelson Y., *Introduction to Biomedical Engineering*, Third Edition, Elsevier, Amsterdam 2012, 609–666.
19. Renger G., Hanssum B., „Oxygen detection in biological systems", *Photosynthesis Research*, 2009, **102**, 487–498.
20. Valentini F., Romanazzo D., Carbone M., Palleschi G., „Modified Screen-Printed Electrodes Based on Oxidized Graphene Nanoribbons for the Selective Electrochemical Detection of Several Molecules", *Electroanal*., 2012, **24**, 872–881.
21. Sajid M., Baig N., Alhooshani K., „Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine: Challenges and opportunities", *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 2019, **118**, 368–385.
22. Ferapontova E. E., „Electrochemical Analysis of Dopamine: Perspectives of Specific In Vivo Detection", *Electrochim. Acta*, 2017, **245**, 664–671.
23. Wu G.-H., Wu Y.-F., Liu X.-W., Rong M.-C., Chen X.-M., Chen X., „An electrochemical ascorbic acid sensor based on palladium nanoparticles supported on graphene oxide", *Anal. Chim. Acta*, 2012, **745**, 33–37.
24. Ćwik P., Wawrzyniak U.E., Jańczyk M., Wróblewski W., „Electrochemical studies of self-assembled monolayers composed of various phenylboronic acid derivatives", *Talanta*, 2014, **119**, 5–10.
25. Camman K., *Zastosowanie elektrod jonoselektywnych*, WNT, Warszawa 1977.
26. Mikhelson K.N., *Ion-Selective Electrodes*, Springer, Berlin, Heidelberg 2013.
27. Pergel E., Gyurcsanyi R.E., Toth K., Lindner E., „Picomolar detection limits with current-polarized Pb^{2+} ion-selective membranes", *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 4249–4253.
28. Shvarev A., Bakker E., „Reversible electrochemical detection of nonelectroactive polyions", *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 11192–11193.
29. Bell-Vlasov A.K., Zajda J., Eldourghamy A., Malinowska E., Meyerhoff M.E., „Polyion selective polymeric membrane-based pulstrode as a detector in flow-

injection analysis", *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 4041–4046.

30. Gemene K.L., Bakker E., „Direct sensing of total acidity by chronopotentiometric flash titrations at polymer membrane ion-selective electrodes", *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3743–3750.

31. Bobacka J., „Potential stability of all-solid-state ion-selective electrodes using conducting polymers as ion-to-electron transducers", *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 4932–4937.

32. Kim Y., Amemiya S., „Stripping analysis of nanomolar perchlorate in drinking water with a voltammetric ion-selective electrode based on thin-layer liquid membrane", *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6056–6065.

33. Kim Y., Rodgers P.J., Amemiya S., „Subnanomolar ion detection by stripping voltammetry with solid-supported thin polymeric membrane", *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7262–7270.

34. Cuartero M., Crespo G.A., Bakker E., „Ionophore-based voltammetric ion activity sensing with thin layer membranes", *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 1654–1660.

35. Bhakthavatsalam V., Shvarev A., Bakker E., „Selective coulometric release of ions from ion selective polymeric membranes for calibration-free titrations", *Analyst*, 2006, **131**, 895–900.

36. Vanamo U., Hupa E., Yrjana V., Bobacka J., „New signal readout principle for solid-contact ion-selective electrodes", *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 4369–4374.

37. Crespo G.A., Mistlberger G., Bakker E., „Electrogenerated chemiluminescence for potentiometric sensors", J*. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 205–207.

38. Jaworska E., Michalska A., Maksymiuk K., „Fluorimetric readout of ion-selective electrode potential changes", *Electrochim. Acta*, 2018, **284**, 321–327.

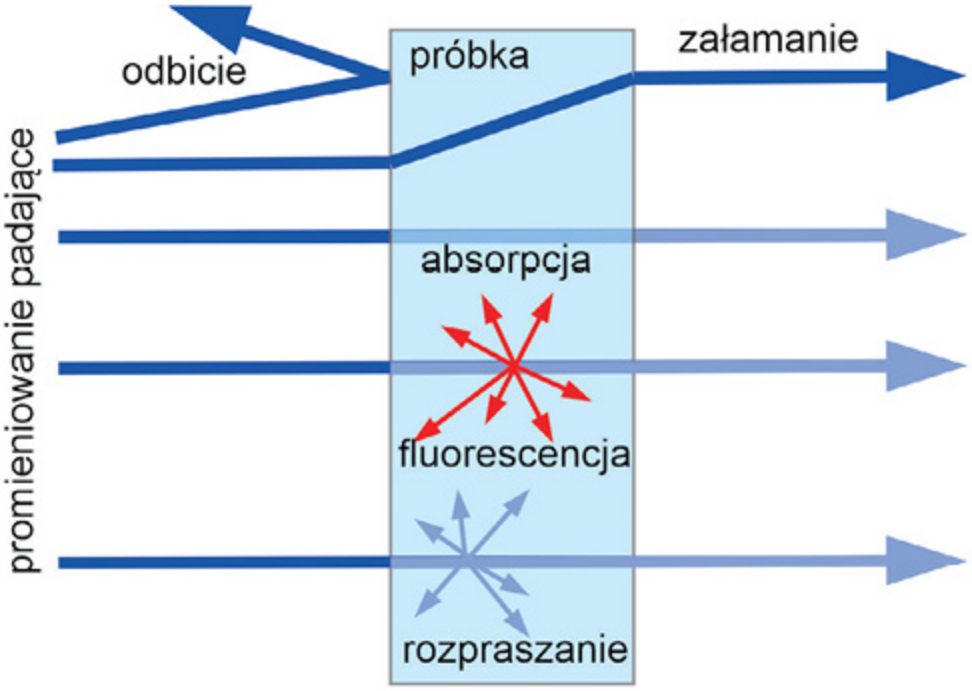
3

Sensory optyczne

Dorota STADNIK, Ewa KOBYLSKA

3.1 Wprowadzenie

Sensory optyczne to urządzenia, które wykorzystują różne formy oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z cząsteczkami analitu do uzyskania informacji o składzie i ilości analitu w próbce. Promieniowanie padające na próbkę może ulec pochłonięciu, rozproszeniu, odbiciu lub może wystąpić emisja promieniowania o innej długości fali (rys. 3.1). Wszystkie te zjawiska, rejestrowane i mierzone przez odpowiednią aparaturę, służą do zdobycia informacji o składzie ilościowym i jakościowym badanej próbki.



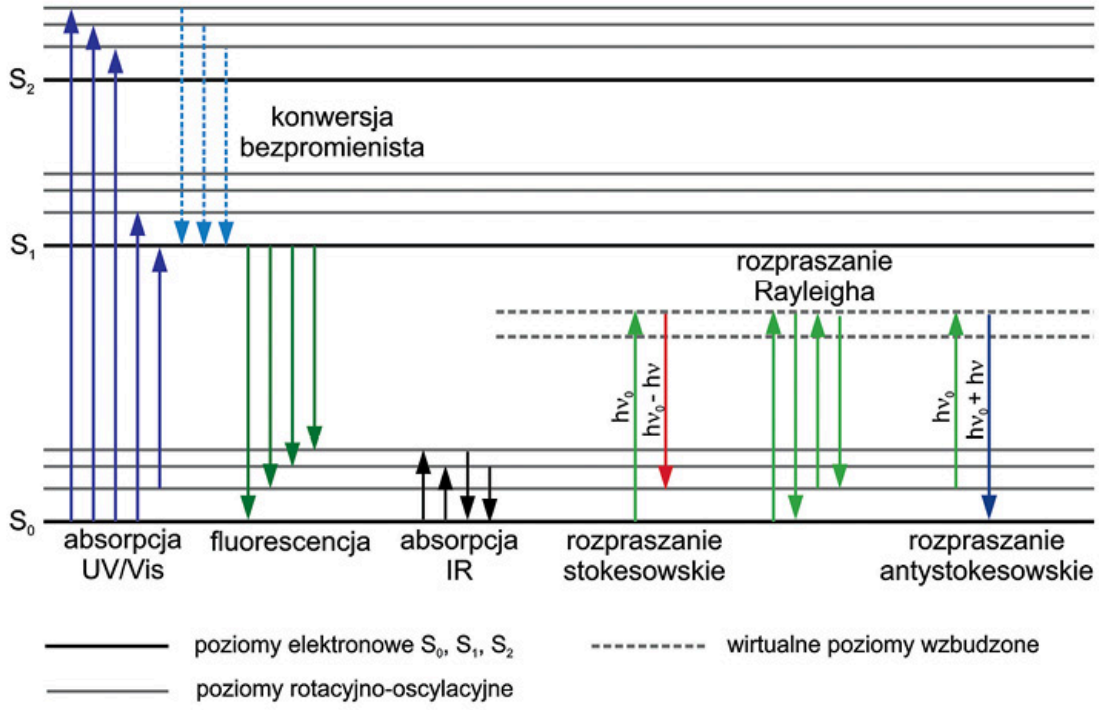
RYS. 3.1

Schemat oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z próbką

Każda cząsteczka ma ściśle określony i charakterystyczny dla siebie układ poziomów energetycznych: elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych (rys. 3.2). W temperaturze pokojowej prawie wszystkie cząsteczki znajdują się na zerowym poziomie oscylacyjnym podstawowego poziomu elektronowego. Absorpcja promieniowania powoduje wzrost energii cząsteczki i zmianę poziomu energetycznego. Warunkiem koniecznym absorpcji promieniowania przez cząsteczkę jest dopasowanie energii fotonu do różnicy poziomów energetycznych cząsteczki. Absorpcja promieniowania widzialnego i ultrafioletowego prowadzi do przejść pomiędzy poziomami elektronowymi. Kwanty promieniowania z zakresu dalekiej podczerwieni wywołują przejścia tylko pomiędzy

poziomami rotacyjnymi, a z zakresu bliskiej podczerwieni – przejścia pomiędzy poziomami oscylacyjnymi.

Stan wzbudzony cząsteczki po absorpcji promieniowania jest nietrwały i cząsteczka dąży do powrotu do stanu równowagi. Na skutek zderzeń z innymi cząsteczkami pozbywa się nadmiaru energii oscylacyjnej w sposób bezpromienisty i powraca do zerowego poziomu oscylacyjnego na wzbudzonym poziomie elektronowym. Następnie cząsteczka wraca na jeden z poziomów oscylacyjnych stanu podstawowego, emitując promieniowanie o energii mniejszej niż energia fotonu wzbudzającego. To emitowane promieniowanie jest nazywane promieniowaniem fluorescencyjnym (rys. 3.2).

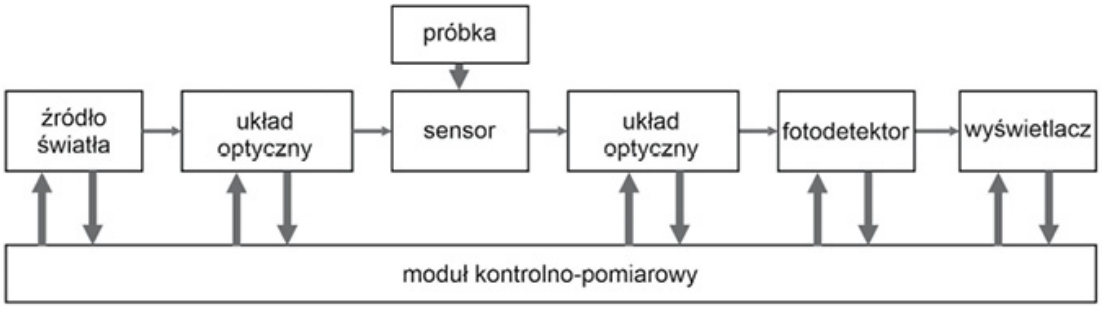


RYS. 3.2

Schemat poziomów energetycznych cząsteczki

Promieniowanie, którego energia nie pasuje do odstępów pomiędzy poziomami energetycznymi, nie jest pochłaniane przez cząsteczki, ale ulega rozproszeniu we wszystkich kierunkach. Promieniowanie rozproszone, którego częstotliwość jest taka sama jak częstotliwość promieniowania padającego, nazywa się rozpraszaniem Rayleigha. Jeśli cząsteczka po oddziaływaniu z promieniowaniem wraca na wyższy poziom oscylacyjny, wtedy promieniowanie rozproszone ma częstotliwość pomniejszoną o różnicę energii poziomów oscylacyjnych. W widmie pojawia się pasmo stokesowskie, przesunięte w stosunku do pasma rayleighowskiego o wartość *v*. W przypadku, cząsteczki, która początkowo znajdowała się na wyższym poziomie oscylacyjnym, a po oddziaływaniu z promieniowaniem przeniosła się na podstawowy poziom oscylacyjny, promieniowanie rozproszone ma częstotliwość większą od promieniowania padającego, co na widmie widoczne jest w postaci pasma antystokesowskiego (rys. 3.2).

Opisane zjawiska są wykorzystywane zarówno w klasycznych technikach spektroskopowych, jak i w sensorach optycznych. Układ pomiarowy sensorów optycznych składa się ze źródła światła, układów optycznych prowadzących wiązkę światła, fotodetektora, układu elektronicznego umożliwiającego rejestrację sygnału oraz sterowanie wiązką światła i układem pomiarowym, komputera z odpowiednim oprogramowaniem oraz modułu sensorowego (rys. 3.3). Wszystkie wymienione tu moduły mogą być samodzielnymi urządzeniami, połączonymi optycznie za pomocą wiązki promieniowania prowadzonej w światłowodzie lub z wykorzystaniem układu optycznego w wolnej przestrzeni albo zintegrowanego na odpowiednim podłożu.



RYS. 3.3

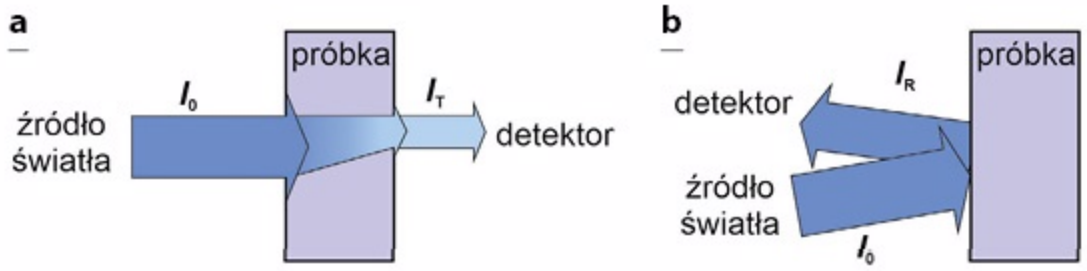
Schemat funkcjonalnych elementów układu pomiarowego zawierającego sensor optyczny

Dzięki rozwojowi mikroelektroniki, optoelektroniki oraz mikrofluidyki możliwa jest obecnie znaczna integracja i miniaturyzacja większości modułów przedstawionego układu pomiarowego. Sensor, którego dwoma istotnymi składnikami są warstwa receptorowa oraz przetwornik, może być tylko niewielkim elementem bardziej złożonego systemu analitycznego typu „lab on a chip". Dodatkowo rozwój tekstyliów, smartfonów i innych urządzeń mobilnych przyśpiesza rozwój elastycznych sensorów ubieralnych (*wearable sensors*), które mogą być noszone przez człowieka podczas codziennych aktywności i służą do monitorowania jego parametrów zdrowotnych.

3.2
Zjawiska optyczne wykorzystywane w czujnikach

3.2.1
Absorpcja i odbicie promieniowania

Chociaż klasyczna spektrofotometria absorpcyjna jest techniką bardzo często wykorzystywaną w laboratoriach analitycznych, to w przypadku czujników – pomiary absorbancji, w trybie transmisyjnym (rys. 3.4 a) są rzadko stosowane. Jeżeli w warstwie receptorowej lub w roztworze obecne są cząstki rozpraszające, ich stężenie musi być takie, aby nie powodowały one rozpraszania w stopniu, który uniemożliwiłby pomiar absorbancji. Poza tym inne składniki próbki, które nie oddziałują z warstwą receptorową, nie mogą absorbować promieniowania w zakresie pomiarowym. W praktyce warunki te są trudne do spełnienia. Dlatego częściej stosuje się czujniki pracujące w trybie odbiciowym (rys. 3.4 b). Promieniowanie odbite od warstwy receptorowej jest przesyłane do fotodetektora tą samą ścieżką co promieniowanie ze źródła światła. Istnieje bogata baza literaturowa o tego typu czujnikach do oznaczania różnorodnych analitów, ale oferta komercyjna jest ograniczona. Przykładem jest czujnik do pomiaru pH firmy World Precision Instruments [1].



RYS. 3.4

Schemat pomiaru w czujnikach światłowodowych: a) tryb transmisyjny, b) tryb odbiciowy

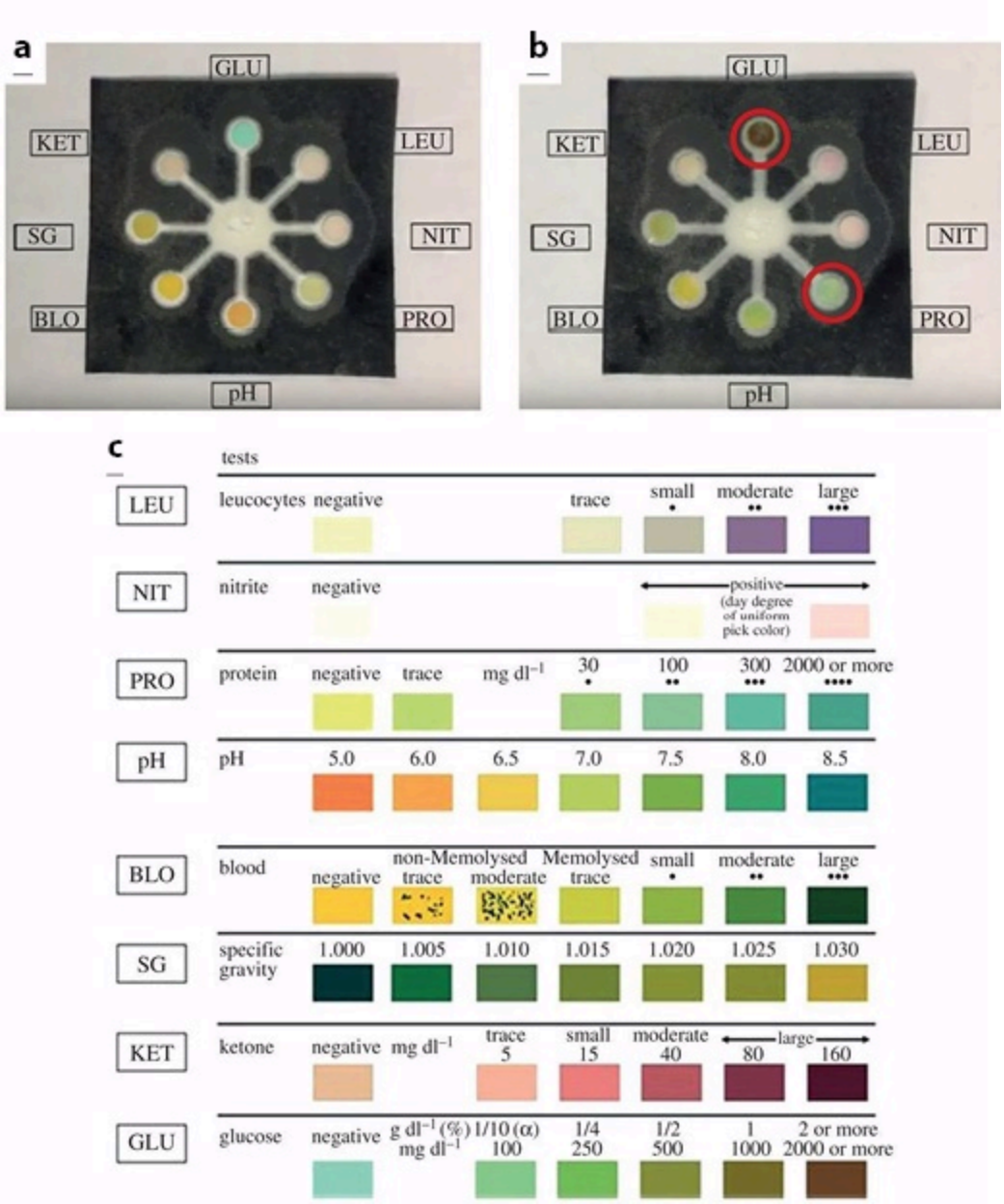
Do grupy czujników, w których wykorzystuje się zmianę barwy pod wpływem analitu, zalicza się tzw. szybkie testy „kasetkowe" oparte na technice immunochromatografii z przepływem bocznym (*Lateral Flow Assay*, LFA). Zasada działania tych testów polega na reakcji cząsteczek analitu obecnych w próbce płynu fizjologicznego z antygenami znakowanymi np. nanocząstkami złota. Powstałe kompleksy w wyniku działania sił kapilarnych migrują wzdłuż papieru chromatograficznego (membrany nitrocelulozowej) do miejsca detekcji, gdzie są wychwytywane przez zaimmobilizowane przeciwciała i tworzą barwne kompleksy. Zmianę barwy można obserwować gołym okiem bez konieczności stosowania jakichkolwiek urządzeń pomiarowych. Pojawienie się barwnych linii kontrolnych i testowych świadczy o dodatnim wyniku testu. Testy te nie pozwalają na ilościowy pomiar analitu, ale ich zaletą jest prostota użytkowania oraz bardzo krótki czas uzyskania wyniku. Znaczną grupę tego typu testów wykorzystuje się w diagnostyce medycznej. Na rynku jest bardzo wiele testów do wykrywania różnego rodzaju bioanalitów, takich jak albumina, transaminazy ALT i AST, narkotyki oraz patogeny, np. bakterie *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pyogenes*, wirusy grypy oraz SARS-CoV-2 [2, 3]. Takie testy

diagnostyczne można wykonać nawet w warunkach domowych bez udziału personelu medycznego. Tradycyjne testy LFA są oparte na ocenie wizualnej i dostarczają jedynie informacji jakościowych o próbce. Obecnie trwają prace nad rozwiązaniami wykorzystującymi zalety testów LFA, ale z detekcją pozwalającą na pomiary ilościowe [4].

Reakcje barwne do detekcji i oznaczania analitów są często wykorzystywane w papierowych, mikroprzepływowych analizatorach (*microfluidic paper-based analytical device*, µPAD) [5]. Są to urządzenia wykorzystujące podłoża z papieru chromatograficznego, na których wytwarza się hydrofobowe kanały przepływowe (np. drukując woskiem) do kierowania próbki oraz odpowiednich odczynników z wlotu do określonego miejsca na chipie do dalszej analizy. Wyniki odczytuje się albo wzrokowo na podstawie zmian i intensywności barwy w miejscach detekcji (rys. 3.5) [6] albo z wykorzystaniem odpowiedniej aplikacji w smartfonie [7].

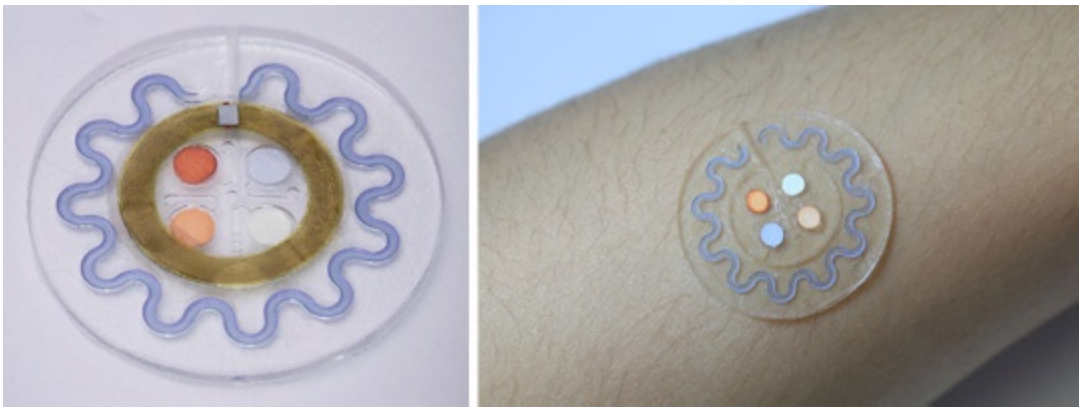
Innym przykładem czujnika kolorymetrycznego na bazie mikrostruktury przepływowej jest ubieralny, elastyczny i wieloparametrowy mikrosystem do monitorowania całkowitej ilości potu, pH, stężenia mleczanów, chlorków i glukozy (rys. 3.6) [8]. Mikrosystem składa się z trzech podsystemów. Spód to warstwa klejąca, biologicznie kompatybilna i bezpieczna dla skóry. W tej warstwie znajdują się otwory, które „zbierają” pot ze skóry, oraz wloty do mikrokanałów znajdujących się w środkowej warstwie, wykonanej z PDMS. W mikrokanałach znajdują się reagenty do kolorymetrycznego oznaczania wody, mleczanów, chlorków, glukozy i pH. Górna warstwa jest również wykonana z PDMS i znajdują się w niej elementy elektroniczne do bezprzewodowej

transmisji danych. Mikrosystem był testowany na ludziach. Wykonano dwie próby: w warunkach kontrolowanego łagodnego wydzielania potu oraz badanie na świeżym powietrzu przeprowadzone podczas długodystansowego wyścigu rowerowego. Do stworzenia sensora wykorzystano gotowe zestawy odczynników do wykrywania glukozy, mleczanów, chlorków i pH, które naniesiono na bibułę filtracyjną i umieszczono w mikrostrukturze. Hydrożel pHEMA zawierający chlorek kobaltu służył jako czujnik wody (potu).



RYS. 3.5

µPAD do kolorymetrycznego oznaczania ośmiu analitów: leukocytów (LEU), azotynów (NIT), białka (PRO), pH, krwi (BLO), ciężaru właściwego (SG), ketonów (KET) i glukozy (GLU); (a) i (b) obserwowane zmiany koloru w strefach reakcyjnych glukozy i białka, (c) zmiany koloru w strefach reakcyjnych można porównać z wykresem kolorów dostarczonym przez producenta [6]

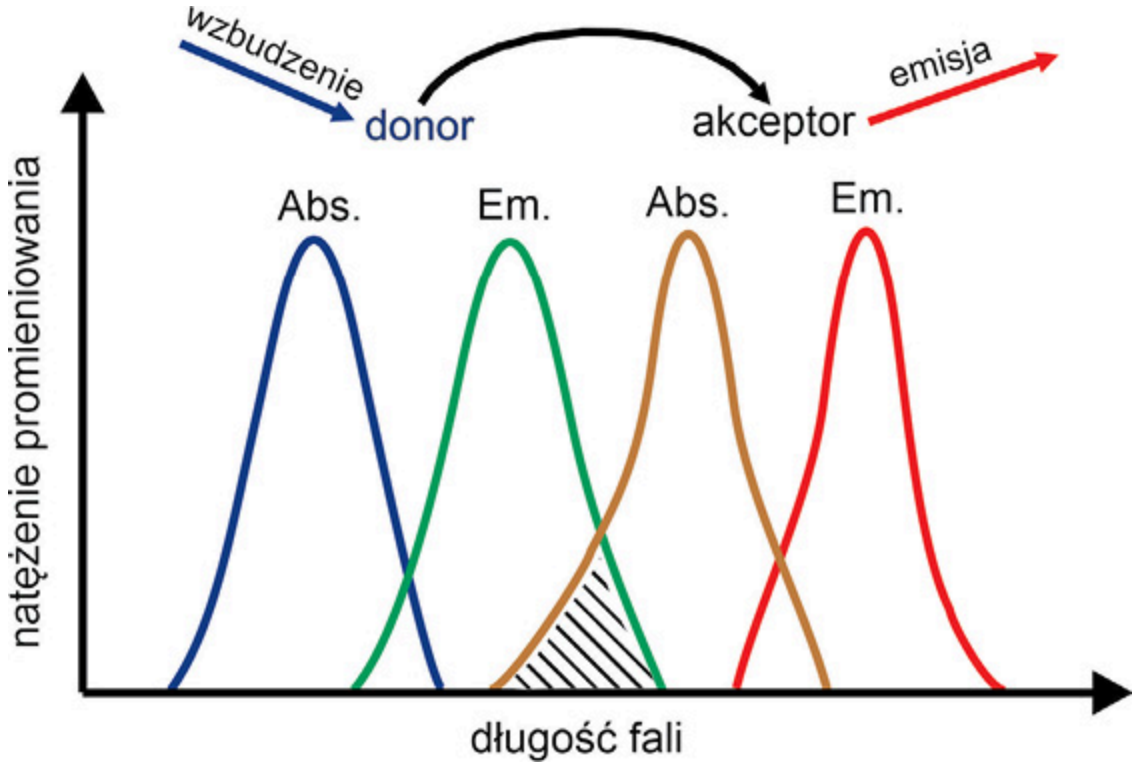


RYS. 3.6
Zdjęcie ubieralnego sensora kolorymetrycznego do wieloparametrowego monitorowania ilości wydzielanego potu, pH, stężenia mleczanów, chlorków i glukozy (dzięki uprzejmości prof. Johna A. Rogersa http://rogersgroup.northwestern.edu)

3.2.2 Fluorescencja

Jak wspomniano na początku tego rozdziału, cząsteczki po absorpcji promieniowania znajdują się we wzbudzonym stanie elektronowym. Powrót do stanu podstawowego może zachodzić bezpromieniście, m.in. na skutek zderzeń z innymi cząsteczkami, promieniście w formie promieniowania fluorescencyjnego (lub fosforencyjnego – gdy po drodze dochodzi do bezpromienistego przejścia ze stanu singletowego do trypletowego) oraz poprzez przeniesienie energii wzbudzenia cząsteczkom innego chromoforu. Takie zjawisko jest nazywane rezonansowym przeniesieniem energii (*Förster Resonance Energy Transfer*, FRET – od nazwiska niemieckiego naukowca Theodora Förstera). Chromofor, który przekazuje energię, jest nazywany donorem, a chromofor absorbujący – akceptorem [9].

Jednym z warunków wystąpienia FRET jest nakładanie się widma fluorescencyjnego donora z widmem absorpcyjnym akceptora (rys. 3.7). Odległość pomiędzy donorem i akceptorem, przy której wydajność FRET wynosi 50%, nazywa się odległością Förstera. Wynosi ona zwykle 15–60 Å, co jest wartością porównywalną z wymiarami białek oraz grubością membran komórkowych. Dlatego metoda ta jest szeroko wykorzystywana w różnego rodzaju badaniach biochemicznych. Wykorzystuje się ją m.in.: w diagnostyce molekularnej, do badania oddziaływań typu białko–białko, antygen–przeciwciało, do badania struktury i konformacji białek i kwasów nukleinowych, do monitorowania rozmieszczenia i transportu lipidów w membranach, do badania procesu zwijania białek, do analizy ilości produktów powstających podczas reakcji łańcuchowej polimerazy w termocyklerach.



RYS. 3.7

Widma absorpcji i fluorescencji donora i akceptora

Mimo że tylko około 10% związków absorbujących światło wykazuje zdolność do emisji promieniowania fluorescencyjnego, wykorzystanie zjawiska fluorescencji, szczególnie do badań biochemicznych i biomedycznych, jest ogromne. Wynika to z upowszechnienia i standaryzacji procedury znakowania i komercyjnej dostępności znaczników fluorescencyjnych. Duże znaczenie ma również wieloparametrowość sygnału fluorescencyjnego (natężenie, anizotropia, wydajność kwantowa, czas życia, przesunięcia fazowe) (rys. 3.8), która przekłada się na różnorodność zastosowań praktycznych. Pomiar natężenia fluorescencji pozwala na wyznaczenie stężenia badanej substancji w próbce zgodnie z zależnością (3.1):

$$I_F = KI_0\varepsilon lc \tag{3.1}$$

gdzie:

I_F – natężenie promieniowania fluorescencyjnego,

I_0 – natężenie promieniowania wzbudzającego,

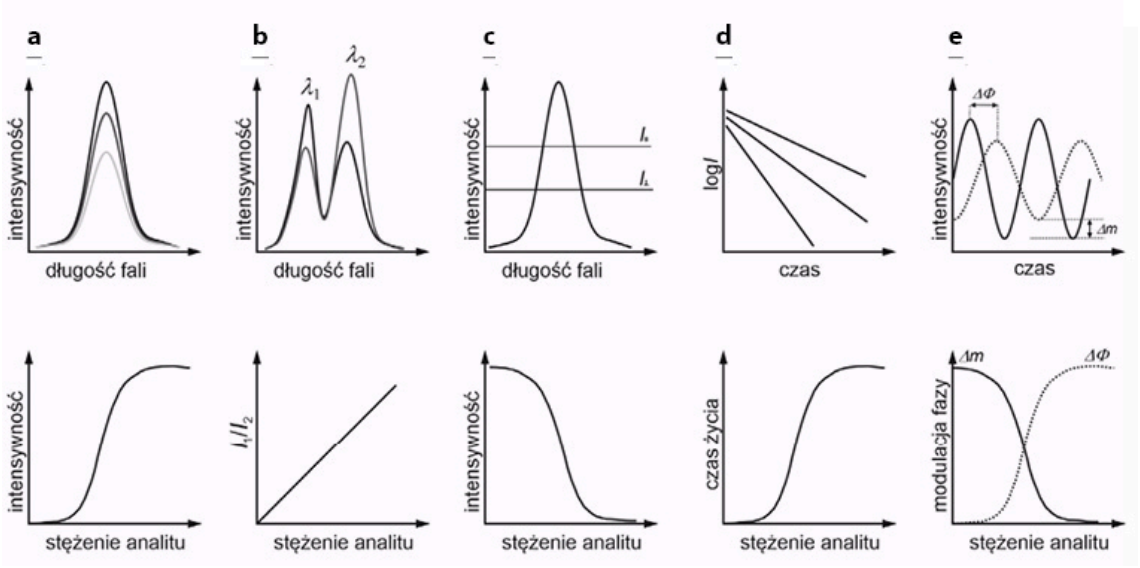
K – współczynnik zależny od parametrów aparatury pomiarowej,

ε – współczynnik absorpcji promieniowania wzbudzającego,

c – stężenie substancji absorbującej promieniowanie,

l – grubość warstwy absorbującej.

Zależność ta jest prostoliniowa, gdy $\varepsilon lc < 0{,}01$, czyli dla bardzo rozcieńczonych roztworów. Dla większych stężeń natężenie fluorescencji maleje ze wzrostem stężenia (rys. 3.8 a).



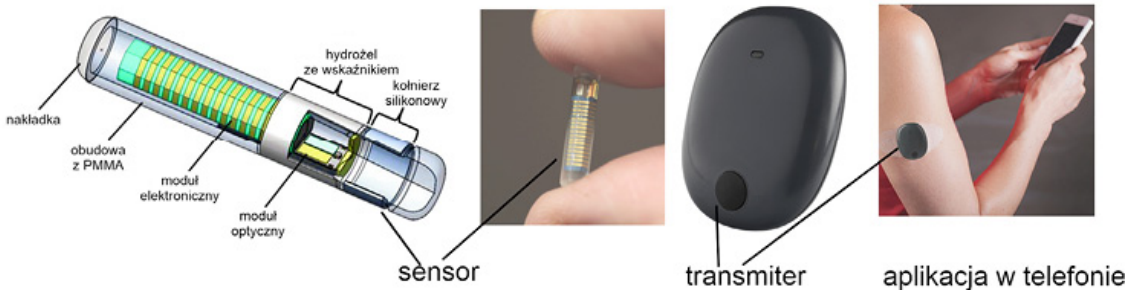
RYS. 3.8

Zmiany spektralne oraz parametry rejestrowane w czujnikach fluorescencyjnych [9]

Przykładem czujnika, który wykorzystuje pomiary natężenia fluorescencji, jest test typu FLA do wykrywania RNA wirusa SARS-CoV-2 [10]. Konstrukcja testu została tak zaprojektowana, aby do pomiarów można było wykorzystać komercyjnie dostępny przenośny analizator z ekranem dotykowym, wyposażonym w źródło światła, fotodetektor, wzmacniacz sygnału oraz drukarkę. Ogromną zaletą tego rozwiązania w porównaniu do techniki PCR jest to, że test może być wykonany przez zwykły personel medyczny w ośrodkach zdrowia i szpitalach, bez konieczności wysyłania próbki do specjalistycznego laboratorium. Test przeszedł pomyślnie badania kliniczne. Drugą jego zaletą jest możliwość szybkiego przeprojektowania do wykrywania innych patogennych cząsteczek RNA.

Innym interesującym przykładem jest czujnik do stałego monitorowania poziomu glukozy we krwi, który zawiera warstwę

receptorową bazującą na hydrożelu z pochodną kwasu boronowego. Jest on zbudowany z cylindrycznego korpusu o długości 18,3 mm, w którym umieszczone są podzespoły elektroniczne, optyczne oraz warstwa receptorowa (rys. 3.9). Korpus umieszcza się pod skórą za pomocą specjalnego aplikatora. Sygnał z sensora jest odbierany przez transmiter, przyklejony za pomocą plastra na ramieniu pacjenta. Transmiter odbiera dane o pomiarze glikemii z sensora i przesyła je do aplikacji w telefonie lub inteligentnym urządzeniu pacjenta. Sensor ten został zatwierdzony do użytku jako wyrób medyczny. Jest on dostępny na rynku m.in. w Europie i USA (Eversense XL).



RYS. 3.9

System do ciągłego monitorowania glukozy Eversense XL

Pomiary natężenia fluorescencji wykorzystuje się również w przypadku wygaszania fluorescencji pod wpływem różnych procesów. Może to być zderzenie cząsteczek fluoroforu z cząsteczkami innego związku, zwanego wygaszaczem, lub utworzenie kompleksu fluorofor–wygaszasz, który nie wykazuje właściwości fluorescencyjnych. Najbardziej znanym wygaszaczem jest cząsteczkowy tlen wygaszający prawie wszystkie znane fluorofory. Wiele małych jonów, takich jak I^-, Br^-, Cu^{2+}, również ma działanie wygaszające. Zjawisko wygaszania fluorescencji jest

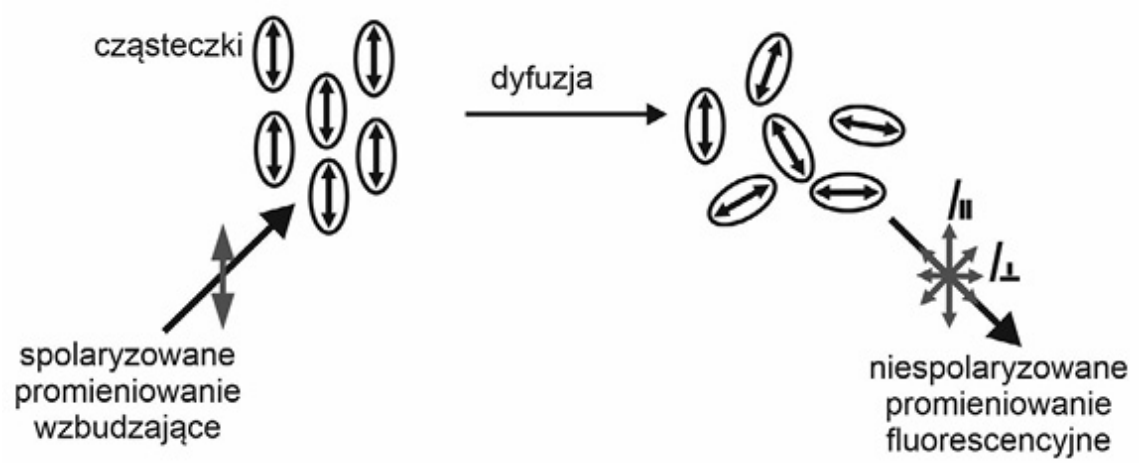
podstawą działania wielu czujników, np. do monitorowania stężenia tlenu. W zależności od zmian stężenia tlenu w próbce, zmienia się natężenie promieniowania fluorescencyjnego, a tym samym również sygnał pomiarowy czujnika zawierającego membranę polimerową z zaimmobilizowanymi cząsteczkami wskaźnika fluorescencyjnego. Na tej zasadzie działają wspomniane wcześniej w tym rozdziale czujniki tlenu. Przykładowym czujnikiem jest światłowodowy czujnik firmy Unisense (rys. 3.10). Na końcu światłowodu znajduje się warstwa receptorowa zawierająca fluorofor, który emituje fluorescencję w zakresie bliskiej podczerwieni 760–790 nm, przy wzbudzeniu promieniowaniem z zakresu 610–630 nm. Intensywność fluorescencji zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia tlenu w badanej próbce.

RYS. 3.10
Światłowodowy czujnik fluorescencyjny do pomiarów stężenia tlenu (za zgodą firmy Unisense)

Jeśli w trakcie pomiarów zmienia się stężenie znacznika fluorescencyjnego (np. wskutek jego dyfuzji lub fotowybielenia, co może mieć miejsce w badaniach z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego), to wykonuje się pomiary ratiometryczne,

stosując odpowiednie znaczniki. Znaczniki ratiometryczne wykazują przesunięcie w widmie absorpcji lub emisji pod wpływem oddziaływania z analitem. Pomiary wykonuje się, stosując wzbudzenie przy dwóch długościach fal λ_1 i λ_2 i wyznacza się stosunek natężenia promieniowania fluorescencyjnego $I_{\lambda 1}/I_{\lambda 2}$, który nie zależy od stężenia fluoroforu (rys. 3.8 b). Takie pomiary stosuje się np. do badania wychwytu komórkowego jonów wapnia, stosując znacznik Fura-2. Natężenie fluorescencji rejestruje się przez zadany czas przy 510 nm i przy wzbudzeniu λ_1 = 340 nm oraz λ_2 = 380 nm. Wyznaczenie I_{340}/I_{380} umożliwia monitorowanie stężenia jonów wapnia w czasie [11].

Kolejnym parametrem promieniowania fluorescencyjnego jest anizotropia (rys. 3.8 c). Wiąże się ona z selektywną absorpcją światła spolaryzowanego przez cząsteczki znajdujące się w roztworze. Światło spolaryzowane jest pochłaniane przede wszystkim przez te cząsteczki, których momenty dipolowe są równoległe do kierunku drgań wektora elektrycznego promieniowania spolaryzowanego (rys. 3.11).



RYS. 3.11

Zjawisko depolaryzacji fluorescencji

Gdyby cząsteczki w stanie wzbudzonym (co trwa około 10–100 ns) były nieruchome, to emitowane światło również byłoby spolaryzowane. Ze względu jednak na dyfuzję translacyjną oraz rotacyjną cząsteczek (w roztworach wodnych obracają się one w ciągu 50–100 ps), promieniowanie fluorescencyjne nie jest spolaryzowane. Mierząc natężenie fluorescencji za pomocą analizatora ustawionego prostopadle i równolegle do kierunku światła wzbudzającego, otrzymuje się odpowiednio dwie wartości $I_{\perp}$ oraz $I_{\parallel}$, na podstawie których oblicza się stopień polaryzacji fluorescencji P (3.2) oraz anizotropię fluorescencji r (3.3):

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \tag{3.2}$$

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \tag{3.3}$$

gdzie:

P – stopień polaryzacji fluorescencji,

r – anizotropia fluorescencji,

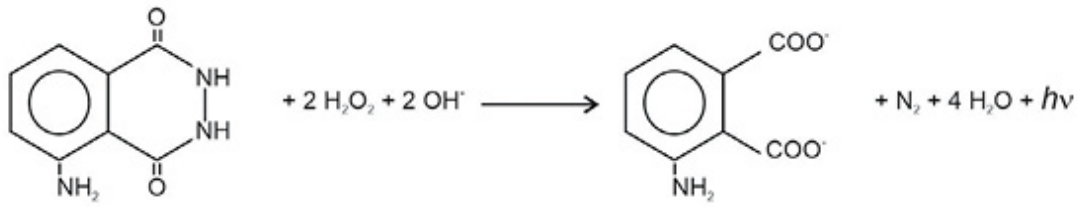
$I_{\perp}$ – natężenie fluorescencji mierzonej prostopadle do kierunku polaryzacji promieniowania wzbudzającego,

$I_{\parallel}$ – natężenie fluorescencji mierzonej równolegle do kierunku polaryzacji promieniowania wzbudzającego.

Pomiary anizotropii dostarczają wielu informacji, zarówno o właściwościach badanych cząsteczek, jak i o środowisku, w którym te cząsteczki się znajdują. Jeśli cząsteczki badanej substancji zaczną reagować z cząsteczkami innej substancji, tworząc nowe kompleksy, to zmieni się szybkość dyfuzji – powstały kompleks będzie poruszał się wolniej, a więc wzrośnie stopień polaryzacji fluorescencji. Pomiary anizotropii są często wykorzystywane w biochemii do badania oddziaływań pomiędzy różnymi białkami. Wykorzystuje się je również w kompetycyjnych testach immunologicznych, gdzie nieznakowany analit konkuruje ze znakowanym analitem o wiązanie z przeciwciałem unieruchomionym na podłożu (np. membranie nitrocelulozowej).

Kolejnym parametrem wykorzystywanym w pomiarach za pomocą sensorów fluorescencyjnych jest czas życia fluorescencji. Jest to średni czas przebywania cząsteczki w stanie wzbudzonym. Pomiary czasu życia fluorescencji prowadzi się albo w domenie czasu, rejestrując krzywą zaniku natężenia fluorescencji po naświetleniu próbki krótkim impulsem laserowym (rys. 3.8 d), albo w domenie częstotliwości, porównując sinusoidalne kształty modulacji promieniowania emitowanego z modulacją promieniowania wzbudzającego (rys. 3.8 e). Pomiary czasu życia fluorescencji pozwalają na śledzenie wielu ważnych procesów biologicznych oraz reakcji biochemicznych, m.in. szybkości dyfuzji, zmian konformacji białek, oddziaływań wzbudzonej cząsteczki z jej otoczeniem.

Promieniowanie fluorescencyjne może być emitowane nie tylko w wyniku absorpcji światła przez cząsteczki, ale również w następstwie pochłonięcia energii wygenerowanej na skutek reakcji chemicznych. Emitowane promieniowanie nazywa się wtedy chemiluminescencją. Spośród niewielkiej liczby reakcji, którym towarzyszy emisja promieniowania, największe znaczenie praktyczne w sensorach ma utlenianie luminolu w środowisku zasadowym. Reakcję tę w uproszczeniu można zapisać równaniem (3.4):



(3.4)

W tych warunkach niezbędny jest dodatek katalizatora. Mogą to być jony metali ciężkich, takich jak: miedź, żelazo, kobalt, chrom lub mangan. Proces ten może zachodzić również w obecności innego utleniacza. Natężenie emitowanego promieniowania jest proporcjonalne do stężenia luminolu, nadtlenku wodoru oraz metali będących katalizatorami. Powszechnie znana jest chemiluminescencja luminolu w obecności śladów krwi, wykorzystywana w kryminalistyce. Katalizatorem utleniania luminolu jest tu żelazo z hemoglobiny. Chociaż możliwe jest ilościowe oznaczanie jonów metali będących katalizatorami reakcji utleniania luminolu, to w biosensorach znacznie częściej wykorzystuje się reakcje enzymatyczne, w których jednym z produktów jest H_2O_2. W reakcji enzymatycznej analit, np. glukoza, kortyzol, cholesterol, etanol, ksantyna, ulega przekształceniu z wydzielaniem H_2O_2 (II),

który z kolei utlenia luminol. Natężenie emitowanego promieniowania zależy od stężenia H_2O_2, które zależy od stężenia analitu (3.5).

$$\text{analit} + O_2 \xrightarrow{\text{enzym}} \text{produkt reakcji} + H_2O_2$$

(3.5)

W oznaczaniu białek oraz testach immunoenzymatycznych często wykorzystuje się reakcję utleniania luminolu pod wpływem peroksydazy chrzanowej (*horseradish peroxidase*, HRP). Przykładem jest bioczujnik CL-LFA do pomiaru poziomu kortyzolu w ślinie [12]. Składa się on z kartridża, w którym znajduje się moduł mikroprzepływowy, pasek LFA, ręcznie aktywowane zawory i zbiorniki na reagenty oraz kamera CCD w konfiguracji obrazowania kontaktowego. Kortyzol z próbki konkuruje z koniugatem HRP–kortyzol o wiązanie z przeciwciałem anty-kortyzol unieruchomionym na linii testowej biosensora. Nadmiar koniugatu kortyzol–HRP jest wychwytywany przez przeciwciało anty-HRP unieruchomione na linii kontrolnej. Dodany na końcu procedury luminol jest utleniany przez HRP. Intensywność sygnału chemiluminescencyjnego linii testowej jest odwrotnie proporcjonalna do ilości kortyzolu w próbce. Czujnik ten był projektowany do stosowania przez astronautów podczas długoterminowych misji kosmicznych.

Koniugaty przeciwciał z HRP lub fosfatazą alkaliczną są szeroko stosowane w testach immunoenzymatycznych. Na rynku są dostępne gotowe zestawy do detekcji chemiluminescencyjnej. W przypadku fosfatazy alkalicznej substratem jest odczynnik o komercyjnej nazwie CDP-Star®.

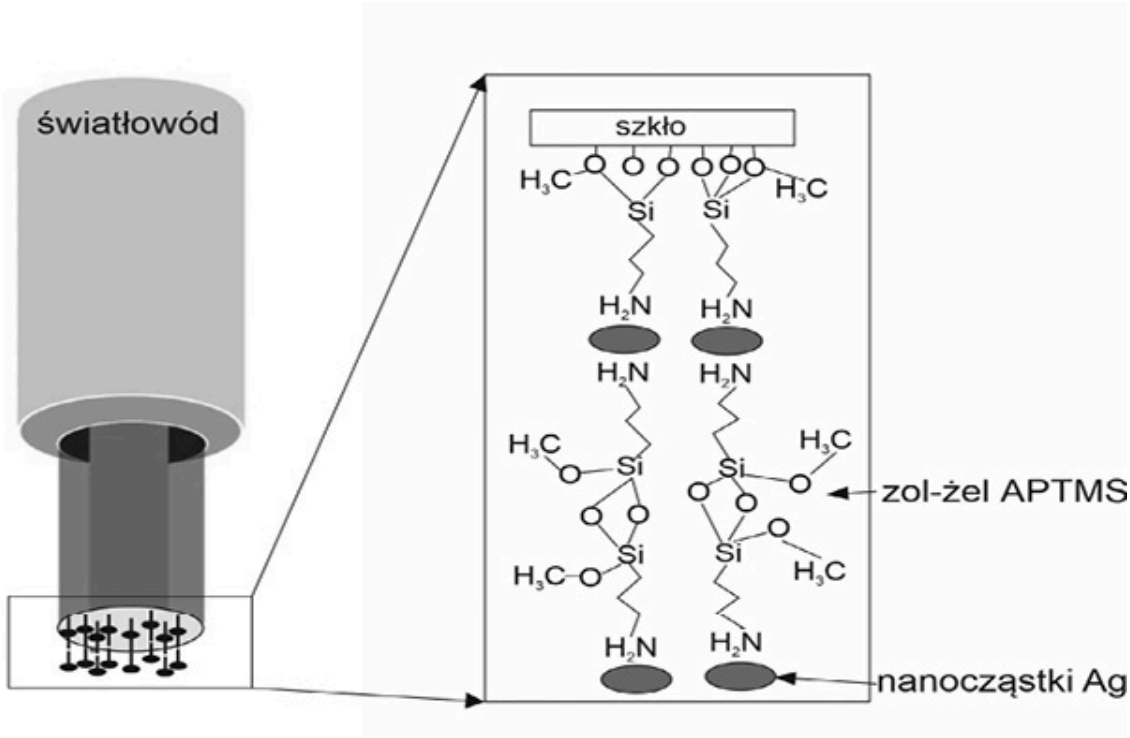
3.2.3
Rozpraszanie Ramana

Spektroskopia Ramana jest wykorzystywana przede wszystkim do identyfikacji substancji i do badania struktury cząsteczek na podstawie widm ramanowskich. Chociaż intensywność rozpraszania ramanowskiego zależy od stężenia substancji, to rzadko ta zależność była wykorzystywana do badań ilościowych. Wynikało to ograniczeń wynikających z samej natury zjawiska rozpraszania ramanowskiego, które jest procesem mało efektywnym.

Rozwój w dziedzinie technologii nanomateriałów przyczynił się również do rozwoju tej techniki i wzrostu jej wykorzystana w czujnikach. Stosując nanocząstki metali, najczęściej złota lub nanostrukturyzowane podłoża pokryte warstwą metalu, uzyskuje się wzmocnienie rozpraszania Ramana. Zjawisko to jest nazywane powierzchniowo wzmocnionym rozpraszaniem Ramana (*Surface-Enhanced Raman Scattering*, SERS). Zwykle uzyskuje się 10^6 razy większy sygnał niż w klasycznej spektroskopii Ramana, bez jednoczesnego wzrostu poziomu tła. W optymalnych warunkach współczynnik wzmocnienia może wynosić 10^{15}. Wzmocnienie sygnału SERS bardzo mocno zależy od geometrycznej charakterystyki metalicznych nanostruktur. Małe zmiany w położeniu atomów w nanostrukturze powodują olbrzymie fluktuacje w intensywności sygnału. Wraz z rozwojem nanotechnologii został wyeliminowany problem braku powtarzalności i jednorodności nanostruktur i tym samym stało się możliwe wykorzystanie SERS w analityce chemicznej i biochemicznej, gdzie jednym z kluczowym wymagań jest powtarzalność pomiarów [13]. Obecnie podłoża SERS

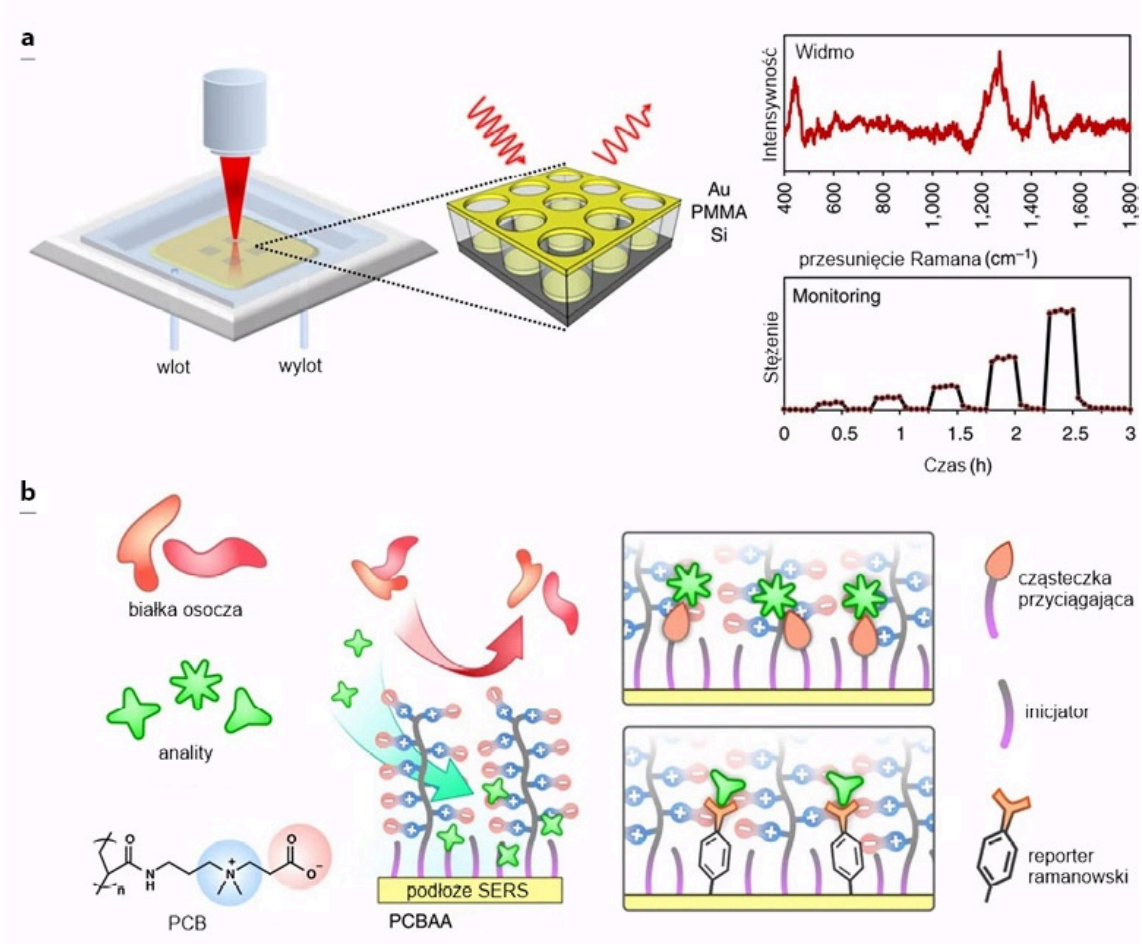
są dostępne komercyjnie wraz z przenośnymi spektrometrami. W Polsce produkcją podłoży SERS zajmuje się SERSitive.

Trwają prace zarówno nad światłowodowymi czujnikami SERS, gdzie nanocząstki są umieszczone na końcu włókna światłowodowego (rys. 3.12) [14], jak i nad czujnikami mikroprzepływowymi (rys. 3.13) [15]. To ostatnie rozwiązanie jest szczególnie popularne ze względu na kompatybilność technologiczną podłoży SERS z układami mikroprzepływowymi. Pojawia się coraz więcej publikacji przedstawiających pomiary ilościowe w takich układach. Udowodniono już, że możliwe jest monitorowanie stężenia leków w osoczu krwi w czasie rzeczywistym nawet bez konieczności usuwania białek osocza przed pomiarami [15].



RYS. 3.12

Schemat światłowodowego czujnika SERS

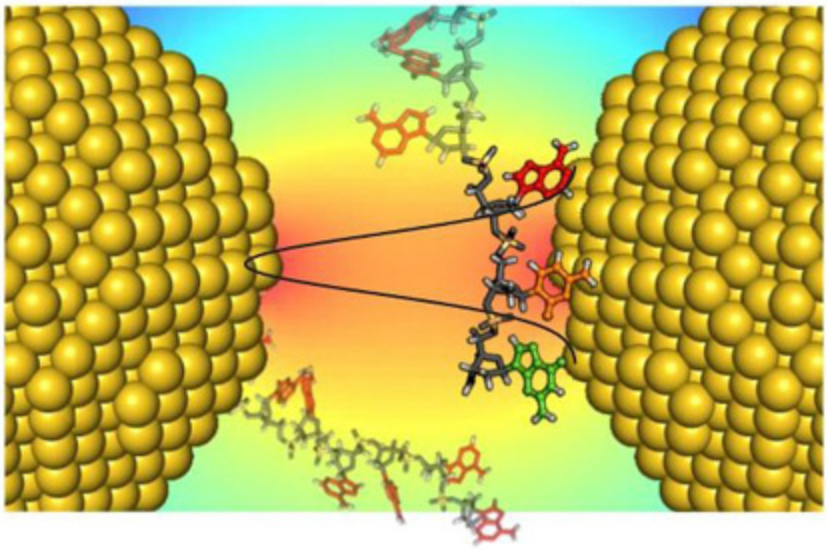


RYS. 3.13

Schemat mikroprzepływowego systemu SERS: a) optofluidyczny system SERS do pomiarów widm i monitoringu stężenia w czasie rzeczywistym, b) modyfikowane podłoże SERS [15]

Na podłożach SERS nanostrukturalne elementy stanowią aktywne „gorące punkty”, wokół których, przy powierzchni metal–dielektryk, dochodzi do koncentracji energii pola elektromagnetycznego. Uważa się, że w skrajnych przypadkach obserwowany sygnał SERS z oświetlonego obszaru pochodzi z pojedynczej cząsteczki znajdującej się w obszarze jednego „gorącego punktu” (rys. 3.14). W tym przypadku sygnał SERS wykazuje silne fluktuacje, ale dzięki zaawansowanym technikom rejestracji sygnału i obróbki danych

możliwe jest badanie pojedynczych cząsteczek, co wykazano na przykładzie nukleotydów analizowanych zarówno w postaci niezwiązanej, jak i w nici DNA [16].



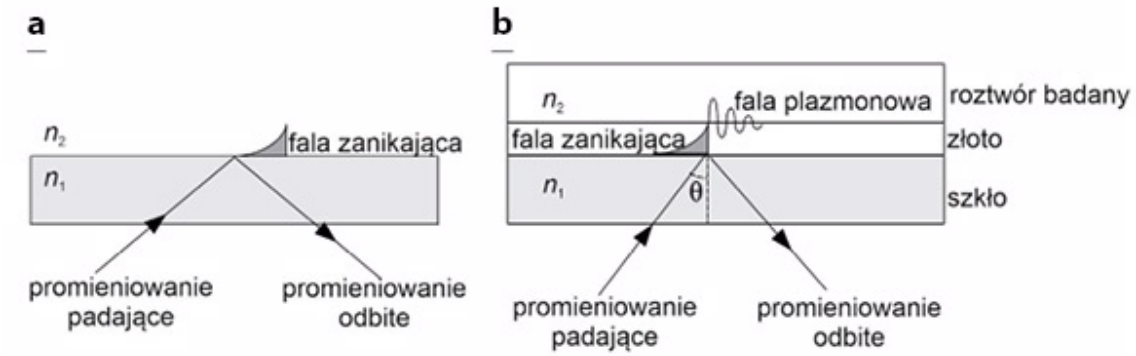
RYS. 3.14

Schemat nanoszczeliny z zaadsorbowaną cząsteczką ssDNA. Tło reprezentuje lokalizację pola elektromagnetycznego a czarna krzywa profil SERS [16]

3.2.4 Zmiana współczynnika załamania światła

Promieniowanie padające pod kątem większym od tzw. kąta krytycznego na granicę dwóch ośrodków o różnych współczynnikach załamania światła ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu (rys. 3.15). Część tego promieniowania wnika na małą głębokość do drugiego ośrodka, tworząc pole elektromagnetyczne, zwane falą

zanikającą (*evanescent wave*), która rozprzestrzenia się równolegle do granicy ośrodków. Jeśli dodatkowo między tymi ośrodkami znajduje się cienka warstwa metalu, to promieniowanie, padając na tę warstwę, pobudza do drgań elektrony poruszające się pomiędzy zrębami atomowymi w metalu. Jeśli częstotliwość fali elektromagnetycznej odpowiada częstotliwości drgań własnych elektronów, to następuje rezonans i powstają fale elektromagnetyczne, zwane plazmonami powierzchniowymi, rozchodzące się poprzez elektrony w bardzo płytkiej warstwie na powierzchni metalu. Zjawisko to nazywa się rezonansem plazmonów powierzchniowych (*Surface Plazmon Rezonance*, SPR), a kąt padania promieni świetlnych, przy którym ono występuje, nosi nazwę kąta rezonansowego θ [17].

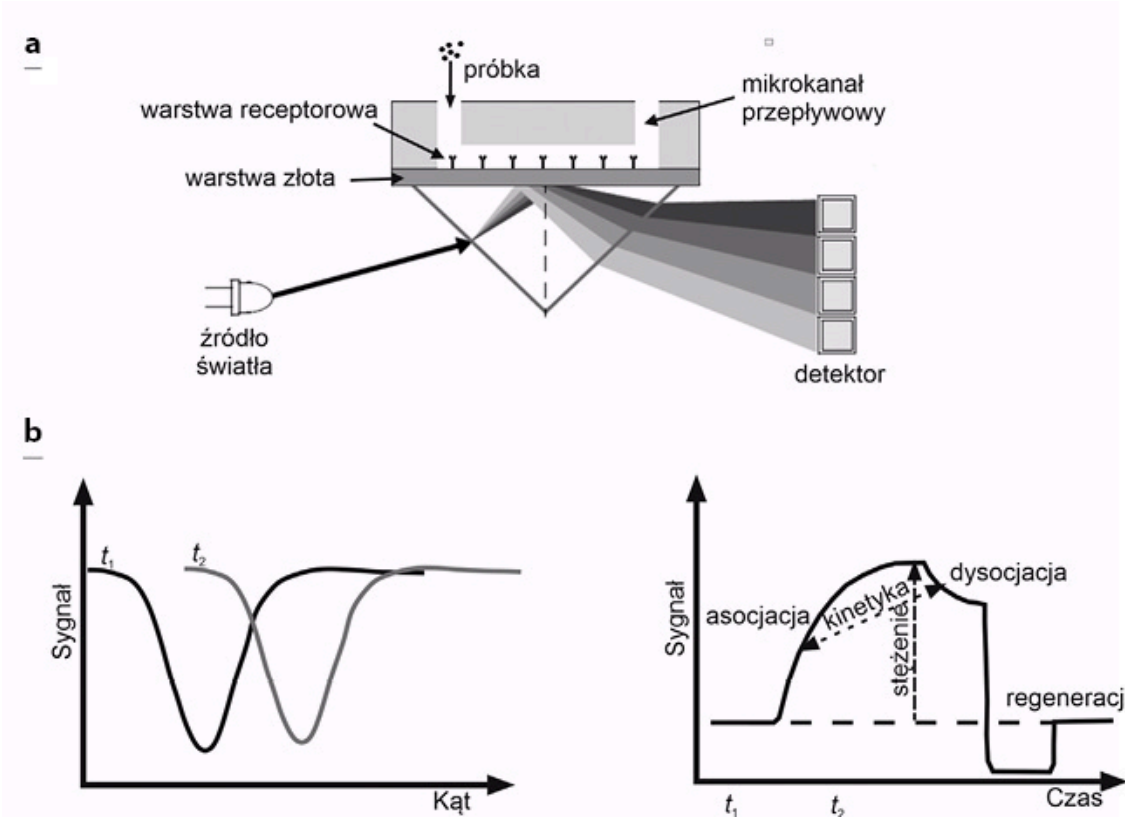


RYS. 3.15

Powstawanie fali zanikającej i plazmonowej na granicy ośrodków

Jeśli zmieniają się właściwości ośrodka, który znajduje się nad warstwą metaliczną, to prędkość plazmonów, podobnie jak prędkość światła, ulegnie zmianie, a tym samym zmieni się kąt rezonansowy, który można dokładnie zmierzyć, mierząc intensywności promieniowania odbitego. W przypadku rezonansu plazmonów

powierzchniowych głównym czynnikiem wpływającym na warunki rezonansu jest współczynnik załamania światła roztworu znajdującego się nad warstwą metalu. Do badania innych parametrów, takich jak stężenie lub aktywność biologiczna, czujnik modyfikuje się powierzchniowo tak, aby zmiana mierzonego parametru związana była ze zmianą współczynnika załamania światła. W tym celu na warstwie złota lub innego metalu immobilizuje się cząsteczki receptora lub przeciwciała, które selektywnie reagują z cząsteczkami analitu znajdującego się w przepływającym roztworze. Pozwala to na śledzenie kinetyki reakcji w czasie rzeczywistym. Wyniki pomiarowe są zwykle prezentowane w postaci tzw. sensogramu, który pozwala również na ilościowe określenie zawartości analitu w roztworze (rys. 3.16).



RYS. 3.16

a) Schemat sensora SPR, b) przykładowe sygnały rejestrowane techniką SPR

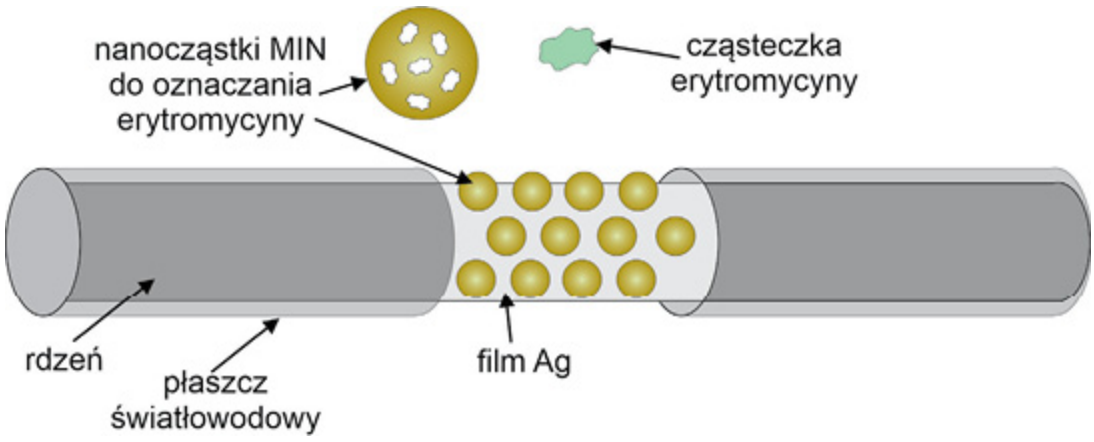
Technika SPR łatwo podlega miniaturyzacji. Obecnie chipy i analizatory SPR są produkowane masowo. Oprócz prostych konstrukcji przeznaczonych do badań pojedynczych próbek istnieją również chipy wielokanałowe i mikromacierze, które umożliwiają przeprowadzenie jednoczesnej analizy wielu substancji w tym samym czasie. Z tego powodu technika SPR ma szerokie zastosowanie w wysokosprawnych badaniach przesiewowych (*high-throughput screening*, HTS). Wykorzystuje się ją do badania oddziaływań: ligand–receptor, antygen–przeciwciało, białko–białko, białko–RNA, białko–DNA, białko–komórka. Ma to praktyczne zastosowanie, np. w poszukiwaniu skutecznych leków oraz monitorowaniu w czasie rzeczywistym ekspresji genów.

Jako warstwę metaliczną w układach SPR można stosować: srebro, złoto, miedź, glin oraz ind, ale najczęściej wykorzystuje się złoto ze względu na jego bardzo małą reaktywność. Optymalna grubość warstwy wynosi około 50 nm. Zamiast warstwy metalu stosuje się też metaliczne nanocząstki. Układy z metalicznymi nanostrukturami i nanocząstkami, które stanowią swoiste plazmonowe „gorące punkty” (*hot spots*), mają zdolność do wzmacniania efektywności zjawisk optycznych, których intensywność zależy od intensywności lokalnego pola elektromagnetycznego. Do tych zjawisk zalicza się m.in. powierzchniowo wzmocnione rozproszenie ramanowskie (*surface-enhanced Raman scattering*, SERS), wzmocnioną przez metal fluorescencję (*metal-based fluorescence*, MEF) oraz powierzchniowo wzmocnioną absorpcję

w podczerwieni (*surface-enhanced IR absoprtion*, SEIRA). Zjawiska te również wykorzystuje się w czujnikach.

Tradycyjne układy pomiarowe SPR bazują na modulacji kąta padania światła. Rejestruje się wtedy krzywą zależności natężenia reflektancji od kąta padania oraz krzywą zależności sygnału SPR w czasie. Możliwy jest wtedy pomiar tylko jednej próbki. Znacznie popularniejszy jest układ pomiarowy ze stałym kątem padania oraz kamerą CCD rejestrującą promieniowanie odbite. Określa się go jako obrazowy rezonans plazmonów powierzchniowych (*surface plasmon resonance imaging*, SPRI). Umożliwia on jednoczesny pomiar wielu próbek.

Do wzbudzenia plazmonów powierzchniowych można wykorzystywać nie tylko układ bazujący na pryzmacie, lecz także światłowody. W trakcie badań są czujniki światłowodowe, w których część płaszcza zastępuje się metalicznym ustrukturyzowanym filmem. Przykładem jest czujnik do oznaczania erytromycyny w produktach spożywczych (rys. 3.17) [18].

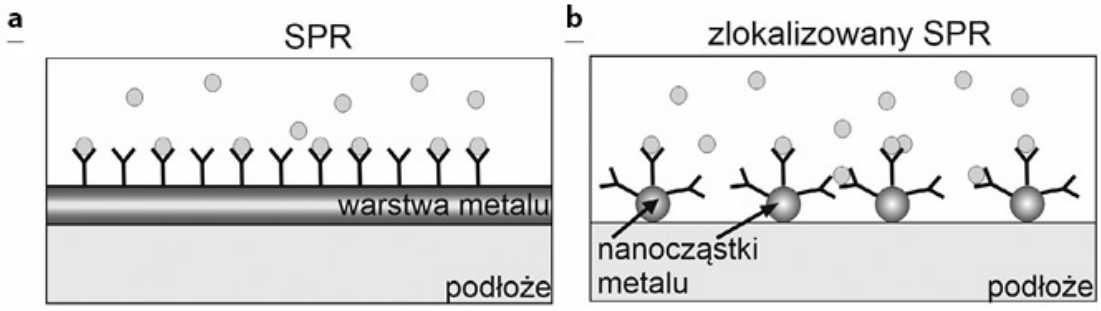


RYS. 3.17

Światłowodowy sensor SPR (*moleculary imprinted nanoparticles*, MIN)

Dzięki postępom w technologii nanomateriałów technika SPR nadal intensywnie się rozwija, ponieważ warstwy metaliczne w strukturach SPR zastępuje się nanocząsteczkami. Powstające wtedy zjawisko nazywa się zlokalizowanym rezonansem plazmonów powierzchniowych (*localized surface plasmon resonance*, LSPR). LSPR jest związany z oscylacją elektronów na metalicznej nanocząstce, wzbudzanych bezpośrednio za pomocą światła o częstości odpowiadającej oscylacji elektronów (rys. 3.18) [19].

Precyzyjnie dopasowany rozmiar i kształt nanostruktur w podłożu pozwala na uzyskiwanie właściwości optycznych niespotykanych wcześniej w skali makro. Nanocząstki metali, w przeciwieństwie do warstw metalicznych, wykazują silną absorpcję w zakresie widzialnym, NIR i UV, co znacznie rozszerza ich obszar zastosowania jako nanoplazmonicznych platform czujnikowych.



RYS. 3.18

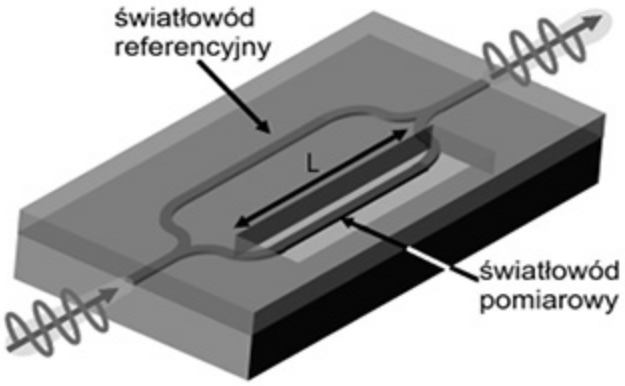
Schemat przedstawiający różnice w strukturze warstwy receptorowej a) SPR i b) LSPR

3.2.5
Interferencja światła

Zasada działania czujników interferometrycznych opiera się na interferencji fal świetlnych biegnących dwiema różnymi drogami. Światło emitowane przez źródło jest prowadzone w światłowodzie i rozdzielane na dwie wiązki, które po przebyciu różnych dróg optycznych łączą się i trafiają do fotodetektora (rys. 3.19). Jedna z wiązek jest wiązką referencyjną i jej parametry nie zmieniają się w czasie. Druga wiązka zmienia się pod wpływem odziaływania z badaną próbką. W rezultacie obserwuje się przesunięcie fazowe w widmie interferencyjnym. Dotychczas zaproponowano wiele konstrukcji czujników interferometrycznych (typu Fabry–Perot, Mach–Zehnder, Michelson, Sagnac), których opis można znaleźć w pracach przeglądowych [20-22].

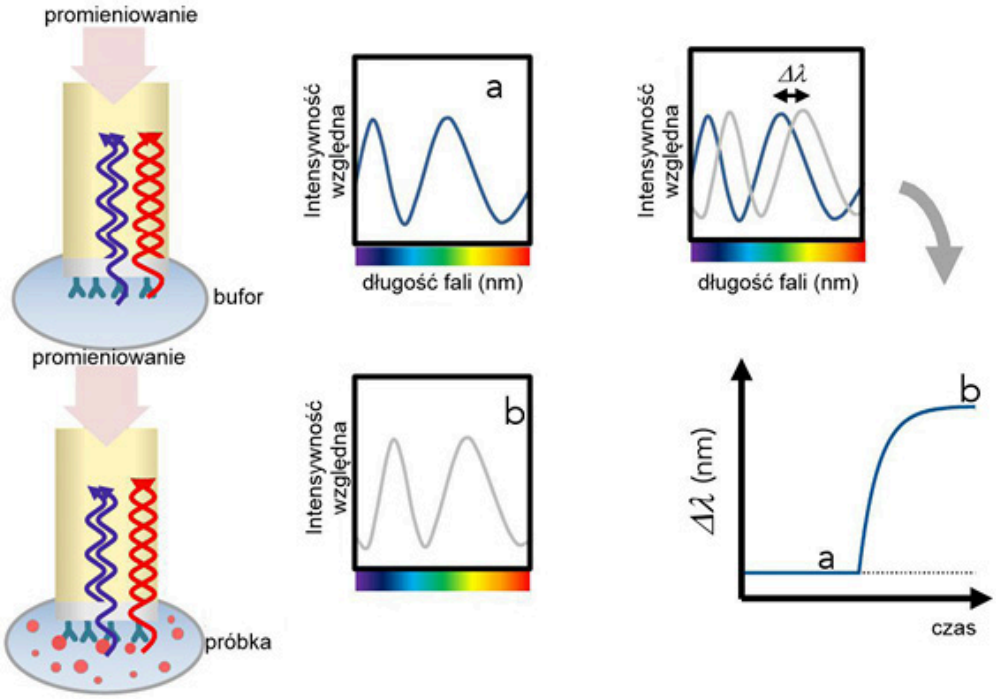
Zjawisko interferencji fal obserwuje się również dla promieniowania odbitego od cienkich warstw. Zostało ono wykorzystane w biowarstwowych sensorach interferometrycznych, które przyczyniły się do rozwoju techniki zwanej interferometrią biowarstwową (*bio-layer interferometry*, BLI), w której mierzy się interferencję światła odbitego od warstwy receptorowej oraz warstwy referencyjnej, znajdujących się na końcu włókna optycznego (rys. 3.20) [23]. Na powierzchni warstwy receptorowej są zaimmobilizowane receptory (np. przeciwciała) wiążące cząsteczki analitu. W wyniku wiązania uzyskuje się przesunięcie długości fali w widmie interferencyjnym. Technika BLI jest bardzo podobna w zakresie aplikacyjnym i uzyskiwanych sensogramów do techniki SPR. Została ona skomercjalizowana i na rynku są już dostępne

analizatory BLI. Zaletą tej techniki, w porównaniu do SPR, jest to, że pomiary mogą być prowadzone w płytkach 96-dołkowych, bez konieczności użycia specjalnych podłoży, natomiast wadą – gorsza powtarzalność.



RYS. 3.19

Schemat czujnika interferometrycznego [20]



RYS. 3.20

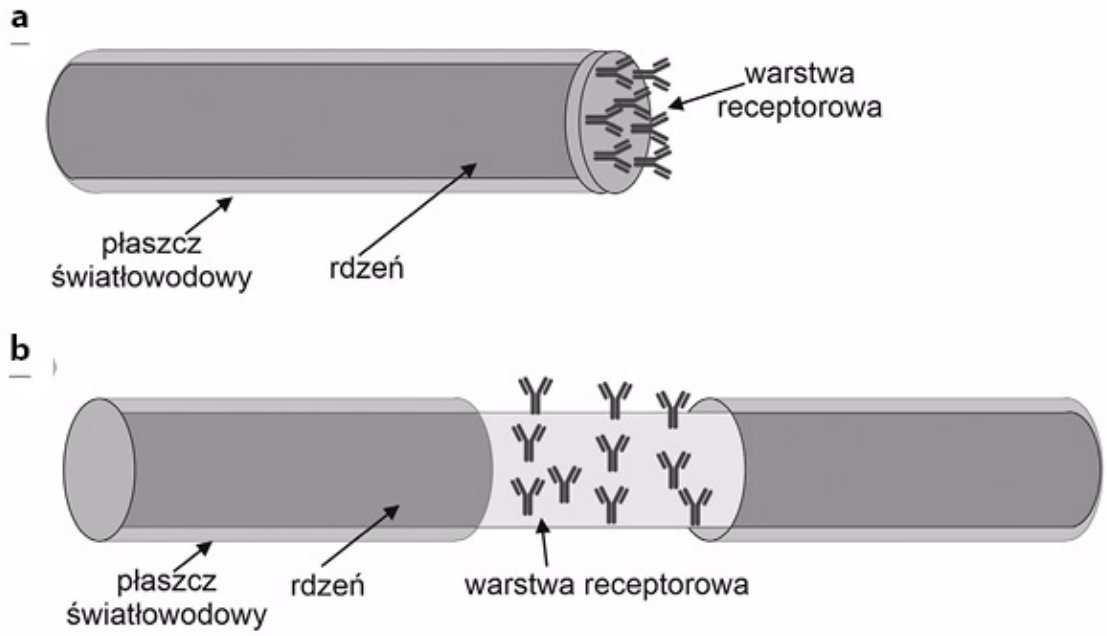
Schemat zasady działania sensora BLI z przykładowym sensogramem (ze strony https://cmi.hms.harvard.edu/biolayer-interferometry)

3.3 Konstrukcje sensorów optycznych

3.3.1 Sensory na bazie włókien optycznych

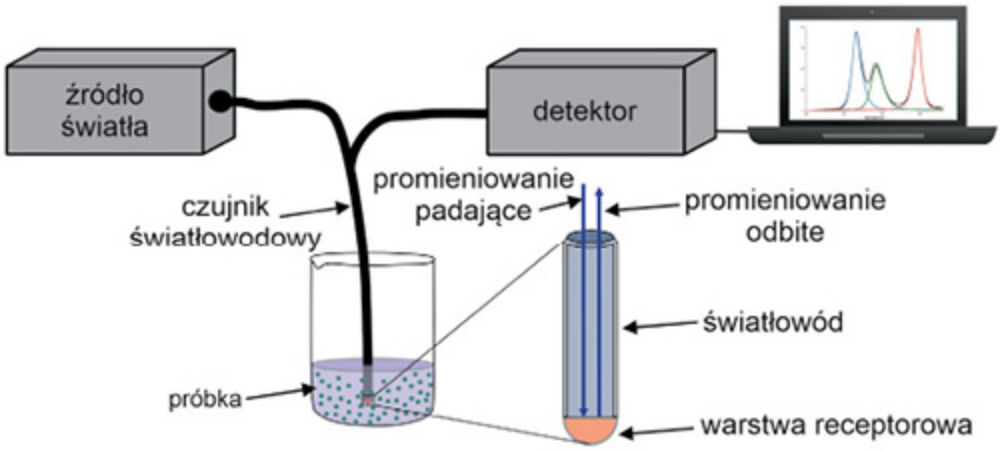
Włókno światłodowe składa się z trzech warstw ułożonych koncentrycznie: w środku znajduje się rdzeń, który jest otoczony płaszczem o współczynniku załamania światła mniejszym niż współczynnik załamania światła rdzenia. Zewnętrzna osłona pełni funkcję ochronną (rys. 3.21). Promieniowanie elektromagnetyczne jest prowadzone w światłowodzie dzięki zjawisku całkowitego wewnętrznego odbicia światła. Część światła dochodząca do granicy ośrodków rdzeń–płaszcz penetruje na małą głębokość do płaszcza, tworząc pole elektromagnetyczne zwane falą zanikającą. Warstwa receptorowa, w której odbywa się detekcja, może być umieszczona na końcu czoła światłowodu (rys.3.21 a) lub w miejscu usuniętego miejscowo płaszcza (rys. 3.21 b). Zmiany zachodzące w tej warstwie pod wpływem oddziaływania receptora z analitem powodują zmiany sygnału optycznego, rejestrowanego przez odpowiedni układ.

W przypadku zastosowania klasycznych włókien światłowodowych warstwa receptorowa może być umieszczona na końcu włókna. Dzięki temu pomiar może odbywać się w miejscu, gdzie znajduje próbka badana (np. w bioreaktorze), w pewnej odległości od pozostałych elementów układu pomiarowego (rys. 3.22). Tego typu sensory do pomiaru stężenia tlenu są dostępne na rynku (np. firmy Unisense i Mettler Toledo).



RYS. 3.21

Schemat światłowodu włóknistego z warstwą receptorową: a) na czole światłowodu, b) w miejscu usuniętego płaszcza

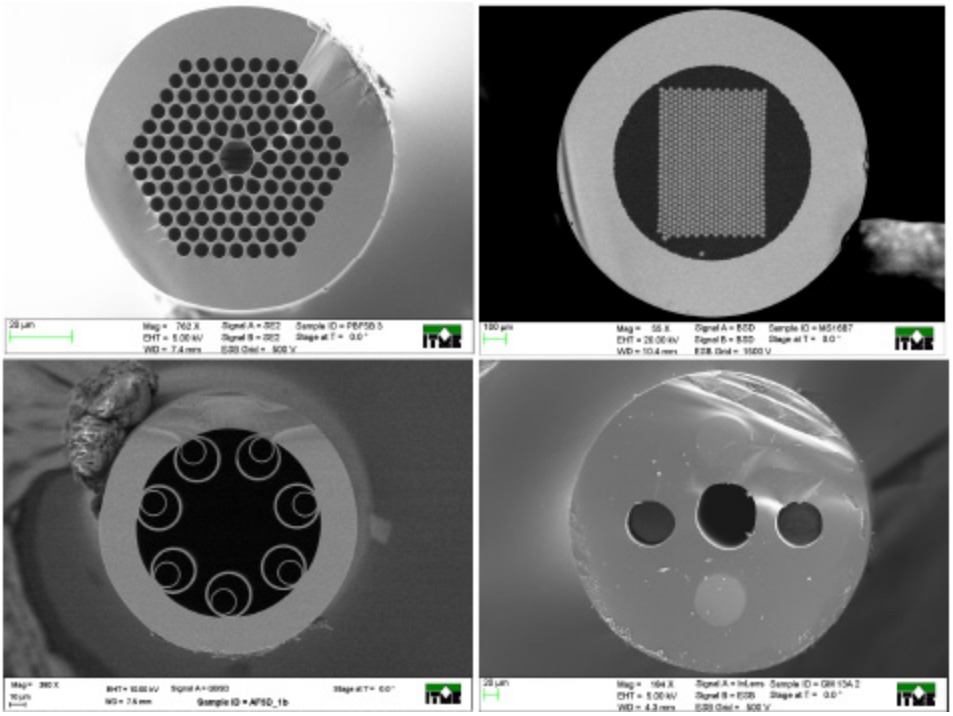


RYS. 3.22

Schemat układu pomiarowego z sensorem światłowodowym

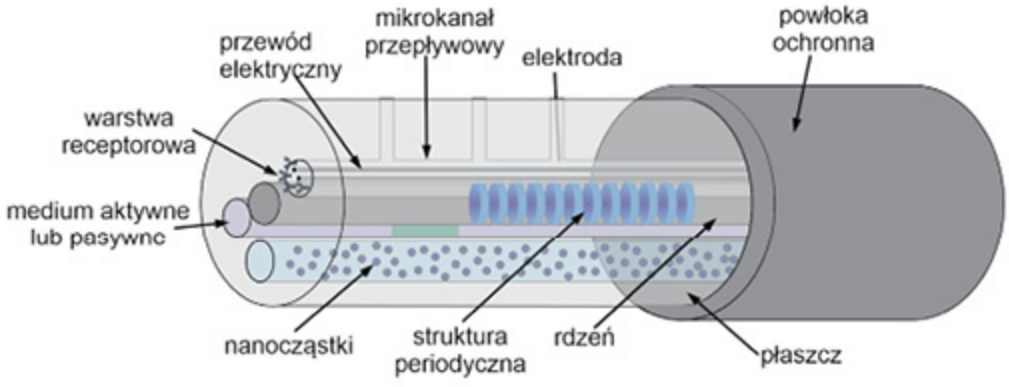
Szczególnym rodzajem włókien światłowodowych są światłowody fotoniczne (*photonic crystal fibers*, PCFs) oraz mikrostrukturyzowane (*microstructured optical fibers*, MOFs), które mają wewnątrz periodyczną strukturę utworzoną z mikro- lub nano-kapilar (rys. 3.23).

Dzięki takiej strukturze światłowody mikrostrukturyzowane charakteryzują się unikatowymi właściwościami optycznymi z ogromnym potencjałem zastosowań w różnych dziedzinach, w tym do konstrukcji czujników. Najwięcej opracowań w chwili obecnej dotyczy sensorów gazowych [18]. Rozwijana jest też koncepcja „laboratorium w światłowodzie" (*Lab-in-a-Fiber*, LIF) [24] (rys. 3.24) w analogii do systemów lab-on-a-chip, zgodnie z którą poszukuje się rozwiązań umożliwiających zintegrowanie większej liczby elementów funkcjonalnych w jednym światłowodzie.



RYS. 3.23

Zdjęcia światłowodów mikrostrukturyzowanych (wytworzone w Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Mikroelektroniki i Fotoniki w grupie badawczej prof. Ryszarda Buczyńskiego)



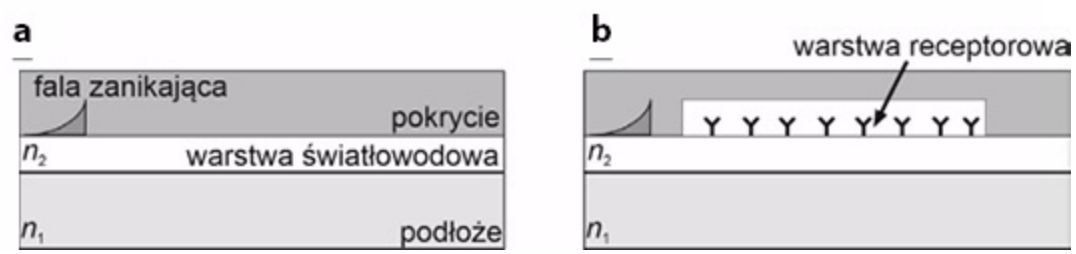
RYS. 3.24

Schemat światłowodu jako propozycja systemu lab-in-a-fiber

Idea „laboratorium w światłowodzie” jest częścią szerszej koncepcji, która obejmuje modyfikacje zwykłego włókna światłowodowego na jego końcu lub fragmencie płaszcza (rys. 3.17 oraz 3.21 a, b) za pomocą różnych nanocząstek (np. nanocząstek złota) lub nanostruktur [25]. Nanostruktury ze względu na swoje unikatowe własności pozwalają na tworzenie czujników nowej generacji o polepszonych parametrach.

3.3.2
Sensory na bazie planarnych światłowodów

Najprostszy światłowód planarny składa się z trzech warstw: podłoża, warstwy światłowodowej, pokrycia. Warstwa środkowa ma większy współczynnik załamania niż warstwy zewnętrzne. Światło jest prowadzone w tej warstwie dzięki całkowitemu wewnętrznemu odbiciu. W sensorach pokrycie górne częściowo zastępuje się warstwą receptorową mającą kontakt z roztworem zawierającym cząsteczki analitu (rys. 3.25). Podobnie jak w przypadku światłowodów włóknistych, wykorzystuje się tu zjawisko fali zanikającej – promieniowania powstającego na granicy ośrodków, które wnika w tym przypadku do warstwy receptorowej. Promieniowanie to pod wpływem oddziaływania z próbką zmienia swoje parametry, których rejestracja pozwala na oznaczanie analitów. W tego typu czujnikach są wykorzystywane zjawiska refrakcji, absorpcji i fluorescencji.



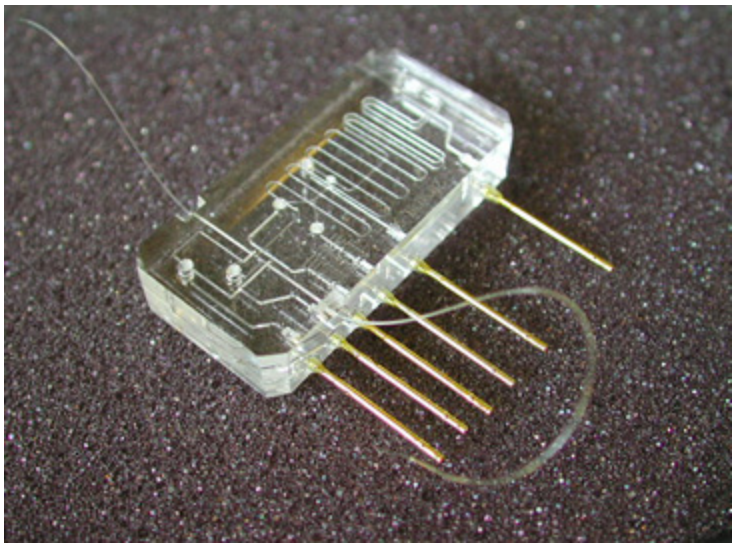
RYS. 3.25

a) Schemat światłowodu planarnego, b) schemat czujnika planarnego

3.3.3 Sensory w mikrosystemach przepływowych

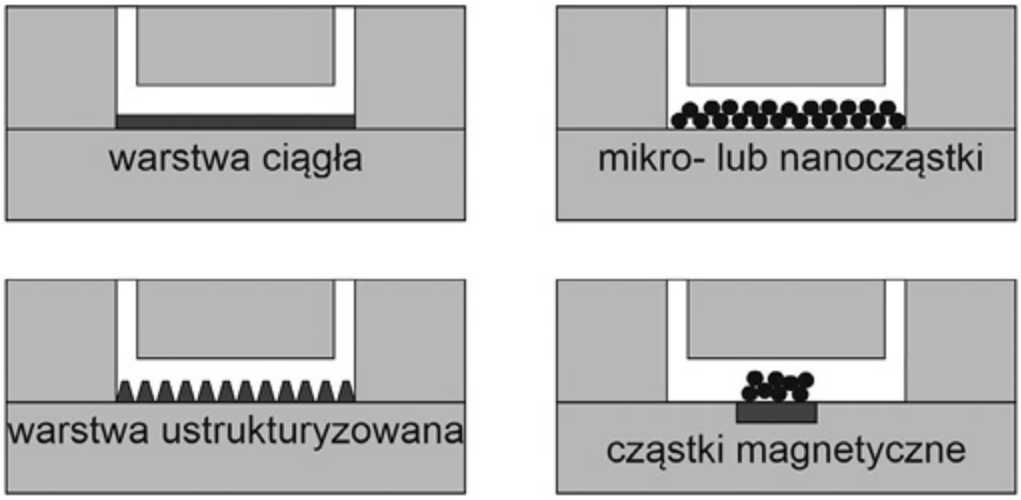
Mikrosystemy przepływowe typu lab-on-a-chip są złożonymi zminiaturyzowanymi analizatorami umożliwiającymi wykonanie kilku etapów procedury analitycznej w jednym urządzeniu. Wiele operacji odbywa się w mikrokanałach przepływowych będącymi kluczowymi elementami tych urządzeń.

Sensory w mikrosystemach przepływowych są zwykle wytwarzane w formie mikrokanału przepływowego, w którym na ściankach znajduje się warstwa receptorowa w postaci cienkiego lub ustrukturyzowanego filmu (rys. 3.27). Mogą to być również mikro- lub nanocząstki, które mają warstwę receptorową (np. cząstki, na powierzchni których zaimmobilizowano przeciwciała). Cząstki te mogą być uwięzione w kanale za pomocą opowiedniej membrany, zaworu albo magnesu.



RYS. 3.26

Przykładowy mikrosystem przepływowy (dzięki uprzejmości dr. Detlefa Snakenborga)



RYS. 3.27

Schemat warstw sensorowych w mikrosystemach przepływowych

3.4 Nanomateriały i funkcjonalizacja warstw receptorowych w sensorach optycznych

3.4.1 Nanomateriały

Nanomateriały w sensorach optycznych mają zastosowanie w postaci nanocząstek (np. kropki kwantowe jako znaczniki luminescencyjne) lub nanostrukturyzowanych powierzchni, które umożliwiają prowadzenie, modulowanie oraz wzmacnianie sygnału optycznego. Jedną z głównych ich zalet jest duża powierzchnia właściwa, co umożliwia unieruchomienie większej ilości cząsteczek receptora. Dzięki temu oraz zdolności do znacznego wzmacniania sygnału możliwe jest zwiększenie czułości sensorów i uzyskanie obniżonej granicy wykrywalności analitów o kilka rzędów wielkości w porównaniu do tradycyjnych konstrukcji.

Opisane w literaturze nanomateriały można podzielić na cztery grupy [26, 27]:

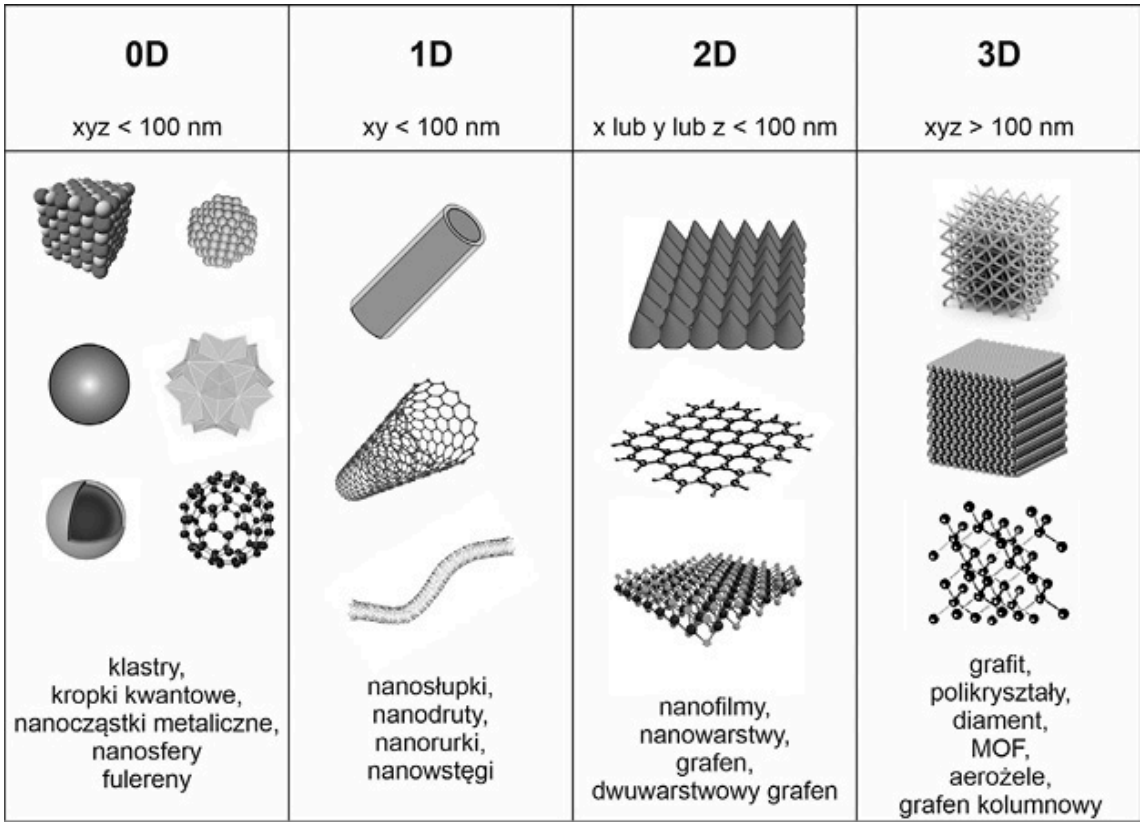
- materiały tworzące struktury typu 0D (cząstki o wymiarach mniejszych niż 100 nm), np. nanocząstki metali szlachetnych, kropki kwantowe (rys. 3.28);
- materiały o strukturze jednowymiarowej (1D) (cząstki o dwóch wymiarach mniejszych niż 100 nm i jednym wymiarze

przekraczającym tę wartość), np. jednościenne i wielościenne nanorurki węglowe;

- materiały tworzące struktury dwuwymiarowe (2D) (cząstki o jednym wymiarze mniejszym niż 100 nm i dwóch wymiarach przekraczających tę wartość), np. jednowarstwowe arkusze grafenu [28], MoS_2, czy tzw. MXeny (np. ZrN, TiN, HfN, TaN),
- materiały tworzące struktury trójwymiarowe (3D) (cząstki o wszystkich trzech wymiarach przekraczających wartość 100 nm): domieszkowane przezroczyste tlenki przewodzące (np. ZnO domieszkowany glinem bądź galem, SnO_2 domieszkowany tlenkiem Sb_2O_3, In_2O_3 domieszkowany cyną), aerożele, czy przestrzenna forma grafenu – grafen słupkowy [29–30].

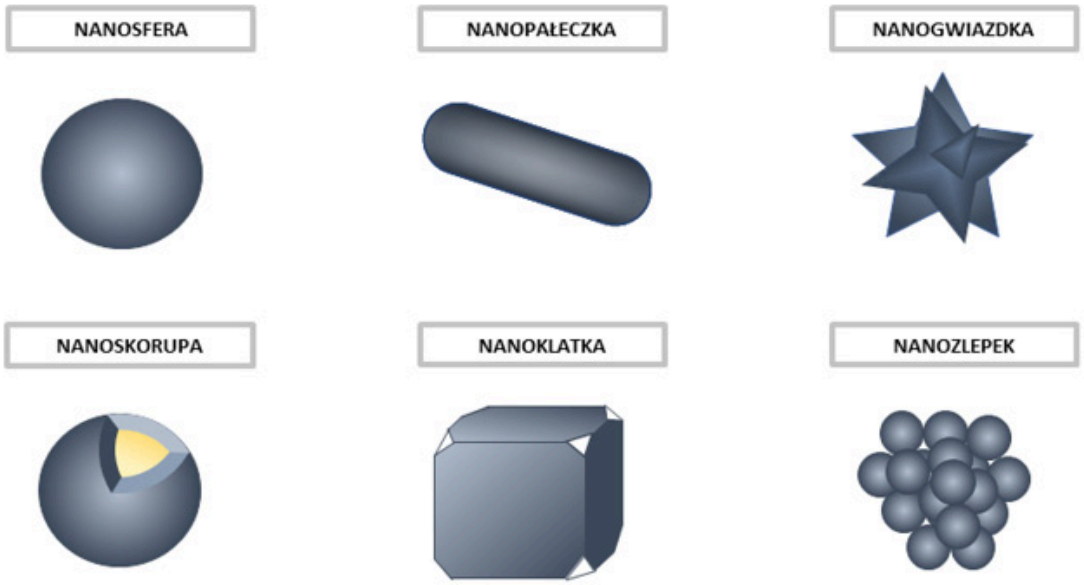
Nanostruktury tworzone przez atomy metali szlachetnych cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem ze względu na swoje unikatowe właściwości. Doniesienia literaturowe wskazują, że w porównaniu do jednorodnych warstw tworzonych przez te same metale, nanocząstki charakteryzują się m.in. silniejszym rozpraszaniem i pochłanianiem światła. Ma to związek z występowaniem zjawiska zlokalizowanego rezonansu plazmonów powierzchniowych (LSPR). Właściwości rezonansowe tych struktur mogą być modyfikowane poprzez zmiany wielkości, kształtu lub wzajemnego położenia nanocząstek. Nanocząstki powstające na drodze redukcji jonów metali w roztworze wodnym przybierają z reguły kształt kuli (*nanosphere*). Możliwe jest również otrzymywanie nanocząstek przyjmujących inne kształty. W przypadku złota udało się uzyskać m.in. formy nanoprętów (*nanorod*), nanogwiazdek (*nanostar*), nanozlepków (*nanocluster*) czy struktur mogących służyć także jako nośniki –

transportery substancji: nanoklatek (*nanocage*) i nanoskorup (*nanoshell*) (rys. 3.29) [31].



RYS. 3.28

Schemat nanostruktur



RYS. 3.29

Przykładowe struktury nanocząstek metali

W przypadku nanoprętów zaobserwowano przesunięcie sygnału LSPR z zakresu UV-Vis, charakterystycznego dla Au, do bliskiej podczerwieni. W przypadku nanogwiazdek sygnał ulega jeszcze dalszemu przesunięciu. Niezwykle interesującą formą są także nanoskorupy. Są to struktury dwuskładnikowe, których rdzeń stanowi dielektryk (np. krzemionka), a warstwę zewnętrzną – metal. W zależności od grubości zdeponowanej warstwy metalu uzyskuje się materiały o zróżnicowanych właściwościach optycznych, których pasma odpowiadające powierzchniowemu rezonansowi plazmonów rozciągają się w zakresie spektralnym od ultrafioletu aż do podczerwieni. W podobny sposób można dostrajać właściwości optyczne nanoklatek – tutaj kluczową rolę odgrywają grubości ścian klatki i wielkość tworzonych przez nie porów. Tak duże zróżnicowanie właściwości materiałów wykonanych z tego samego indywiduum chemicznego umożliwia projektowanie nanostruktur

ściśle dopasowanych do określonych zastosowań analitycznych [31–33]. Nanocząstki metali mogą być także dodatkowo modyfikowane, ich powierzchnia może być funkcjonalizowana poprzez dowiązanie cząstek takich jak przeciwciała monoklonalne, białka, streptawidyna, co znacznie poszerza zakres ich potencjalnych zastosowań w wytwarzaniu selektywnych biosensorów.

Spośród alotropowych form węgla najszersze zastosowanie w sensorach znajdują nanorurki węglowe, węglowe kropki kwantowe oraz grafen i jego pochodne (rys. 3.30).

RYS. 3.30
Struktury alotropowych form węgla: nanorurek, grafenu jednowarstwowego i słupkowego [34, 35]

Nanorurki węglowe (*carbon nanotubes*, CNT) to cylindryczne struktury zbudowane z atomów węgla o hybrydyzacji sp^2, o średnicach mieszczących się w zakresie nano- i długościach w zakresie mikro- (struktury typu 1D). Jeżeli strukturę tworzy pojedynczy cylinder, mamy do czynienia z nanorurkami jednościennymi (*single-walled carbon nanotubes*, SWCNT). Nanorurki wielościenne (*multi-walled carbon nanotubes*, MWCNT) tworzą koncentrycznie ułożone cylindry o promieniach różniących się od siebie o dystans ok. 3,4 Å. Nanorurki węglowe wykazują bardzo

dobre właściwości mechaniczne (są niezwykle wytrzymałe i sztywne). Zmienność obserwowanych właściwości elektrycznych i optycznych poszczególnych nanorurek jest ściśle skorelowana z ich długością i średnicą [36].

Kropki węglowe (*ang. Carbon Dots*, CD) to sferyczne nanostruktury o średnicach ok. 10 nm (typu 0D), zbudowane z atomów węgla o hybrydyzacji sp^2 lub (rzadziej) sp^3, wykazujące wyjątkowo silne właściwości fluorescencyjne. W czasie ich wytwarzania powierzchnie tych struktur są wzbogacane w grupy funkcyjne, takie jak: C=O, C–O, C–OH, C=C, które następnie mogą być wykorzystane w procesie funkcjonalizacji powierzchni kropek. Daje to bardzo szerokie możliwości praktycznego zastosowania tych materiałów w biosensorach [36].

Grafen jest przezroczystym materiałem tworzącym płaskie struktury złożone z atomów węgla połączonych na wzór plastra miodu. Wykazuje on bardzo dobre przewodnictwo ciepła i wyjątkowo wysokie przewodnictwo elektryczne, bardzo dobrze absorbuje też promieniowanie elektromagnetyczne w szerokim zakresie długości fal (od ultrafioletu do podczerwieni). Z grafenu można wytwarzać różne nanostruktury, np. w postaci warstw (2D) i struktur słupkowych (3D) [37].

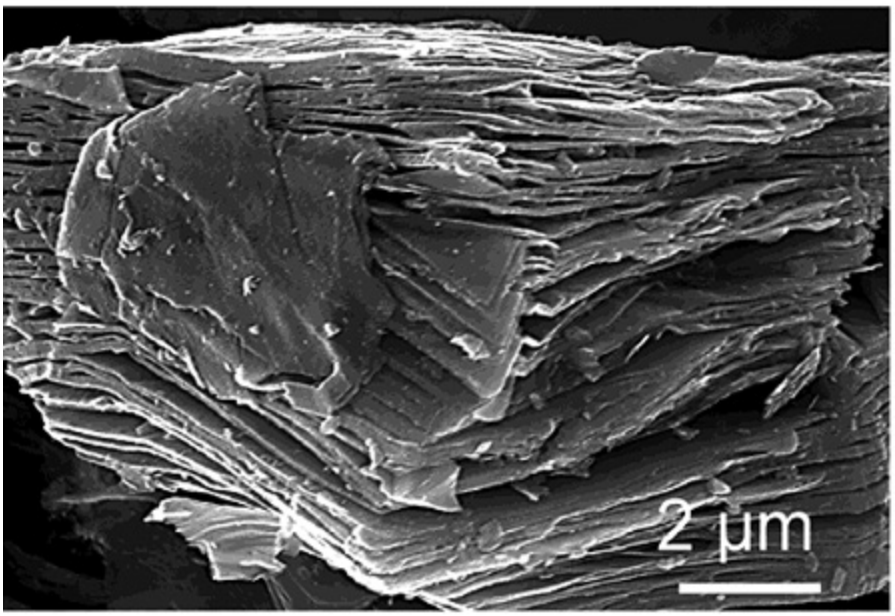
W ostatnich latach duże zainteresowanie naukowców skupiło się na tzw. MXenach. Jest to grupa ok. 20 hydrofilowych związków tworzących dwuwymiarowe nanostruktury podobne do grafenu, wykazujących jednocześnie wiele pożądanych właściwości fizykochemicznych. Są to materiały charakteryzujące się dużą twardością, odpornością chemiczną, biozgodnością, przewodnością cieplną i elektryczną, a także zdolnością do nadprzewodnictwa lub

przeciwnie – będące świetnymi izolatorami [31, 38, 39]. Do grupy MXenów są zaliczane węgliki, azotki albo węglikoazotki metali przejściowych o wzorze ogólnym $M_{n+1}X_n$ (M –atomy metali przejściowych, X –atomy węgla i azotu). Wyróżniamy 3 podstawowe typy MXenów: M_2X, M_3X_2 oraz M_4X_3, różniące się między sobą strukturą i właściwościami.

Ze względu na swoje unikatowe właściwości elektryczne MXeny mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako elementy sensorowe. Znalazły zastosowanie m.in. w roli wygaszaczy w technikach opartych na badaniu zjawiska wygaszania fluorescencji (np. sensor fluorescencyjny do wykrywania wirusa brodawczaka ludzkiego-HPV [40]). Tworzone przez nie warstwowe struktury 2D (rys. 3.31) stanowią także dobre podłoża do immobilizacji różnego typu biomolekuł (przeciwciał, DNA, aminokwasów i peptydów) [41], co wykorzystano m.in. do opracowania testu do wykrywania egzosomów [42].

Jednym z najważniejszych wyzwań w dziedzinie plazmoniki i opracowywania nowych metamateriałów jest minimalizowanie generowanych strat. Materiałami charakteryzującymi się bardzo niskimi stratami w zakresie bliskiej podczerwieni i światła widzialnego są domieszkowane przezroczyste tlenki przewodzące (*transparent conducting oxides*, TCO), do których są zaliczane m.in.: tlenek cynku domieszkowany glinem (Al:ZnO, AZO), tlenek cynku domieszkowany galem (Ga:ZnO, GZO), tlenek cyny domieszkowany tlenkiem antymonu (Sb_2O_3:SnO_2, ATO) oraz tlenek indu domieszkowany cyną (Sn:In_2O_3, ITO) [30]. Materiały te, wykorzystywane już obecnie w przemyśle, m.in. jako budulec ekranów ciekłokrystalicznych, mogą wykazywać właściwości

metaliczne w bliskiej podczerwieni, przy czym ich właściwości optyczne zależą od parametrów fizycznych budowanego przez nie materiału. Mogą zatem być „dostrajane” do planowanego zastosowania poprzez odpowiednią modyfikację grubości warstwy materiału [44].



RYS. 3.31
Warstwowa struktura MXenów [43]

3.4.2
Funkcjonalizacja powierzchni

Systemy detekcji optycznej mogą opierać się na bezpośrednich pomiarach właściwości optycznych analitu bądź na pomiarach pośrednich, jeżeli badana cząstka nie wykazuje czynności optycznej. W tym drugim przypadku niezbędna jest obecność „mediatora” (wskaźnika), czyli substancji, która w wyniku interakcji z analitem

generuje sygnał optyczny, możliwy do wykrycia i zmierzenia. Chemiczne mediatory stosowane w sensorach umieszcza się w warstwie receptorowej, stosując immobilizację fizyczną (bezpośrednia adsorpcja na powierzchni) lub chemiczną (połączenie mediatora z powierzchnią za pomocą trwałego wiązania chemicznego) [45]. O zastosowaniu konkretnej techniki immobilizacji zwykle decydują względy praktyczne, wynikające z założonego zastosowania projektowanego czujnika i związanych z tym ograniczeń (środowisko pomiarowe, właściwości analitu).

Sensory wykorzystujące metody immobilizacji fizycznej (np. adsorpcja enzymów lub selektywnych przeciwciał na nośniku) wykazują zazwyczaj niższą trwałość i mniejszą stabilność niż te przygotowane technikami immobilizacji chemicznej. Wynika to z faktu sukcesywnego wymywania zaadsorbowanych cząsteczek z warstwy czułej sensora. W tym przypadku słabe oddziaływania międzycząsteczkowe (np. elektrostatyczne) lub zmiany warunków środowiska (siły jonowej, pH, temperatury) mogą stanowić siłę napędową procesu desorpcji z podłoża.

Immobilizacja chemiczna polega na trwałym związaniu cząsteczki odpowiedzialnej za chemiczne rozpoznanie analitu z podłożem sensora. Tworzenie takich trwałych wiązań może prowadzić do obniżenia czułości wybranego wskaźnika w stosunku do analitu [46]. Proces immobilizacji chemicznej musi być więc zaprojektowany w taki sposób, aby zapewnić połączenie odpowiedniej sondy z podłożem z zachowaniem w jak największym stopniu jej aktywności chemicznej, zapewnieniem optymalnej orientacji wiązanej cząstki w przestrzeni oraz dobrej dostępności dla analitu. Osiągnięcie oczekiwanej wysokiej czułości i selektywności czujnika

wymaga także zminimalizowania ryzyka zaimmobilizowania niepożądanych cząsteczek w wyniku tworzenia wiązań niespecyficznych.

Do najważniejszych technik immobilizacji chemicznej należą tworzenie trwałych wiązań kowalencyjnych oraz unieruchamianie cząsteczek z wykorzystaniem zjawiska powinowactwa biologicznego (np. streptawidyna–biotyna (SB); białko A, białko G). Wymienione techniki pozwalają na uzyskanie konstruktów charakteryzujących się wysoką stabilnością i optymalną siłą wiązania zaimmobilizowanych cząsteczek. Tworzenie wiązań kowalencyjnych jest nieodwracalne, natomiast wykorzystanie układu SB pozwala na wykonanie immobilizacji w sposób odwracalny i dużo lepiej kontrolowany.

Immobilizacja chemiczna jest jedną z podstawowych technik modyfikowania podłóż metalicznych (np. do SPR). Jako elementy rozpoznania biologicznego, przyłączone do metalowego podłoża, najczęściej są wykorzystywane przeciwciała oraz aptamery kwasów nukleinowych [47]. Wykorzystuje się w tym celu także enzymy, peptydy i białka oraz cukry i glikoproteiny. Immobilizacji przeciwciał na powierzchniach metali szlachetnych dokonuje się, wykorzystując bezpośrednio słabe oddziaływanie tworzone między powierzchnią metalu a resztami cysteiny w łańcuchach polipeptydowych lub z wykorzystaniem odpowiednich łączników (np. $HS–(CH_2)_n–COOH$, $HS–(CH_2)_n–CHO$, $CS_2/NH_2–(CH_2)_n–NH$, $HS–(CH_2)_n–NH$). Podobny mechanizm chemisorpcji może być stosowany w przypadku immobilizacji aptamerów.

Słabe wiązania między molekułami są także wykorzystywane w technikach opartych na zjawisku powinowactwa. W tym wypadku są tworzone układy zbudowane z podłoża, odpowiednich biomolekuł

służących jako łączniki oraz cząsteczek odpowiedzialnych za rozpoznanie analitu. Wytwarzanie słabych interakcji między tymi elementami układu umożliwia wysoce specyficzny mechanizm rozpoznawania. Najczęściej stosowane są systemy opierające się na interakcji między streptawidyną związaną z podłożem oraz biotyną sprzężoną z odpowiednim aptamerem. Są one już na tyle rozpowszechnione, że odpowiednie elementy składowe do tworzenia takich konstruktów są dostępne komercyjnie. W przypadku wykorzystania przeciwciał jako molekuł specyficznie rozpoznających analit, stosuje się tzw. białko A lub białko G, związane uprzednio z podłożem.

Literatura

1. www.wpiinc.com/ph-optica-micro-fiber-optic-ph-meter-use-with-microsensors (data dostępu: 01.02.2021 r.).
2. Hwang S.G., Ha K., Guk K., Lee D.K., Eom G., Song S., et al. „Rapid and simple detection of Tamiflu-resistant influenza virus: Development of oseltamivir derivative-based lateral flow biosensor for point-of-care (POC) diagnostics", *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 12999.
3. Yoo S.M., Lee S.Y., „Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms", *Trends Biotechnol.*, 2016, **34**, 1, 7–25.
4. Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., „Towards Lateral Flow Quantitative Assays: Detection Approaches", *Biosensors*, 2019, **9**, 89.
5. Cate D.M., Adkins J.A., Mettakoonpitak J., Henry C.S., „Recent developments in paper-based microfluidic devices", *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 19–41.
6. Suresh V., Qunya O., Kanta B.L., Yuh L.Y., Chong K.S.L, „Non-invasive paper-based microfluidic device for ultra-low detection of urea through enzyme catalysis", *R. Soc. Open Sci.*, 2018, **5**, 171980.

7. Li F., Hu Y., Li Z., Liu J., Guo L., He J., „Three-dimensional microfluidic paper-based device for multiplexed colorimetric detection of six metal ions combined with use of a smartphone", *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, **411**, 6497–6508.

8. Koh A., Kang D., Xue Y., Lee S., Pielak R.M., Kim J., et al. „A soft, wearable microfluidic device for the capture, storage, and colorimetric sensing of sweat", *Sci. Transl. Med.*, 2016, **8**, 366ra165.

9. Lakowicz J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, Berlin 2006

10. Wang D., He S., Wang X., Yan Y., Liu J., Wu S., et al. „Rapid lateral flow immunoassay for the fluorescence detection of SARS-CoV-2 RNA", *Nat. Biomed. Eng.*, 2020, **4**, 1150–1158.

11. Dura B., Dougan S.K., Barisa M., Hoehl M.M., Lo C.T., Ploegh H.L., et al., „Profiling lymphocyte interactions at the single-cell level by microfluidic cell pairing", *Nat. Commun.*, 2015, **6**, 5940,1–13.

12. Zangheri M., Mirasoli M., Guardigli M., Di Nardo F., Anfossi L., Baggiani C., et al. „Chemiluminescence-based biosensor for monitoring astronauts' health status during space missions: Results from the International Space Station", *Biosens. Bioelectron.*, 2019, **129**, 260–268.

13. Fan M., Andrade G.F.S., Brolo A.G., „A review on recent advances in the applications of surface-enhanced Raman scattering in analytical chemistry", *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1097**, 1–29.

14. Andrade G.F.S., Fan M.K., Brolo A.G., „Multilayer silver nanoparticles-modified optical fiber tip for high performance SERS remote sensing", *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **25**, 2270–2275.

15. Sun F., Hung H.C., Sinclair A., Zhang P., Bai T., Galvan D.D., et al. „Hierarchical zwitterionic modification of a SERS substrate enables real-time drug monitoring in blood plasma", *Nat. Commun.*, 2016, **7**, 13437.

16. Chen C., Li Y., Kerman S., Neutens P., Willems K., Cornelissen S., et al. „High spatial resolution nanoslit SERS for single-molecule nucleobase sensing", *Nat. Commun.*, 2018, **9**, 1733.

17. Tang Y., Zeng X., Liang J., „Surface plasmon resonance: An introduction to a surface spectroscopy technique", *J. Chem. Educ.*, 2010, **87**, 742–746.

18. Shrivastav A.M., Usha S.P., Gupta B.D., „Highly sensitive and selective erythromycin nanosensor employing fiber optic SPR/ERY imprinted nanostructure: Application in milk and honey", *Biosens. Bioelectron.*, 2017, **90**, 516–524.

19. Estevez M.C., Otte M.A., Sepulveda B., Lechuga L.M., „Trends and challenges of refractometric nanoplasmonic biosensors: A review", *Anal. Chim. Acta*, 2014, **806**, 55–73.

20. Luan E., Shoman H., Ratner D.M., Cheung K.C., Chrostowski L., „Silicon photonic biosensors using label-free detection", *Sensors*, 2018, **18**, 3519.

21. Lee B.H., Kim Y.H., Park K.S., Eom J.B., Kim M.J., Rho B.S., et al. „Interferometric fiber optic sensors", *Sensors*, 2012, **12**, 2467–2486.

22. Li J., Yan H., Dang H., Meng F., „Structure design and application of hollow core microstructured optical fiber gas sensor: A review", *Opt. Laser Technol.*, 2021, **135**, 106658.

23. Concepcion J., Witte K., Wartchow C., Choo S., Yao D., Persson H., et al., „Label-Free Detection of Biomolecular Interactions Using BioLayer Interferometry for Kinetic Characterization", *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2009, **12**, 791–800.

24. Ricciardi A., Crescitelli A., Vaiano P., Quero G., Consales M., Pisco M., et al., „Lab-on-fiber technology: A new vision for chemical and biological sensing", *Analyst*, 2015, **140**, 8068–8079.

25. Pissadakis S., „Lab-in-a-fiber sensors: A review", *Microelectron. Eng.*, 2019, **217**, 111105.

26. García-Betancourt M.L., Ramírez Jiménez S.I., González-Hodges A., Nuñez Salazar Z.E., Escalante-García I.L., Ramírez Aparicio J., „Low Dimensional Nanostructures: Measurement and Remediation Technologies Applied to Trace Heavy Metals in Water" w: *Trace Metals in the Environment – New Approaches and Recent Advances*, IntechOpen, Londyn, 2021, 1–24.

27. Pomerantseva E., Bonaccorso F., Feng X., Cui Y., Gogotsi Y., „Energy storage: The future enabled by nanomaterials", *Science*, 2019, **366**, 1–12.

28. Liu J., Jalali M., Mahshid S., Wachsmann-Hogiu S., „Are plasmonic optical biosensors ready for use in point-of-need applications?", *Analyst*, 2020, **145**, 364–384.

29. Gonçalves M.R., Minassian H., Melikyan A., „Plasmonic resonators: Fundamental properties and applications", *J. Phys. D Appl. Phys.*, 2020, **53**, 1–41.

30. Korzeb K., Gajc M., Pawlak D., „Przegląd metod otrzymywania materiałów plazmonicznych oraz wybranych alternatywnych materiałów", *Materiały Elektroniczne*, 2014, **42** (2), 18–29.

31. De Freitas L.F., Varca G.H.C., dos Santos Batista J.G., Lugão A.B., „An overview of the synthesis of gold nanoparticles using radiation technologies", *Nanomaterials*, 2018, **8**(939), 1–23.

32. Jain P.K., Huang X., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A., „Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine", *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41** (12), 1578–1586.

33. Gold nanomaterials applications: The role of the shape (nanorods and nanostars), www.nanovexbiotech.com/gold-nanomaterials-applications-role-shape-nanorods-nanostars, (data dostępu: 01.02.2021 r.).

34. Ribeiro B., Botelho E.C., Costa M.L., Bandeira C.F., „Carbon nanotube buckypaper reinforced polymer composites: A review", *Polimeros*, 2017, **27** (3), 247–255.

35. Dimitrakakis G.K., Tylianakis E., Froudakis G.E., „Pillared graphene: a new 3-D network nanostructure for enhanced hydrogen storage", *Nano Lett.*, 2008, **8** (10), 3166–3170.

36. Yap S.H.K., Chan K.K., Tjin S.C., Yong K.T., „Carbon allotrope-based optical fibers for environmental and biological sensing: A review", *Sensors*, 2020, **20** (2046), 1–43.

37. Robb G., „Graphene plasmonics: Ultra-tunable graphene light source", *Nat. Photonics*, 2016, **10**, 3–4.

38. Khan R., Andreescu S., „Mxenes-based bioanalytical sensors: Design, characterization, and applications", *Sensors*, 2020, **20** (5434), 1–19.

39. Anasori B., Lukatskaya M.R., Gogotsi Y., „2D metal carbides and nitrides (MXenes) for energy storage", *Nat. Rev. Mater.*, 2017, **2** (16098), 1–7.

40. Peng X., Zhang Y., Lu D., Guo Y., Guo S., „Ultrathin Ti_3C_2 nanosheets based "off-on" fluorescent nanoprobe for rapid and sensitive detection of HPV infection", *Sens. Actuators B Chem*., 2019, **286**, 222–229.

41. Yaqoob S.B., Adnan R., Rameez Khan R.M., Rashid M., „Gold, Silver, and Palladium Nanoparticles: A Chemical Tool for Biomedical Applications", *Front. Chem.*, 2020, **8**, 1–15.

42. Zhang Q., Wang F., Zhang H., Zhang Y., Liu M., Liu Y., „Universal Ti_3C_2 MXenes Based Self-Standard Ratiometric Fluorescence Resonance Energy Transfer Platform for Highly Sensitive Detection of Exosomes", *Anal. Chem*., 2018, **90**, 12737–12744.

43. Naguib M., Mashtalir O., Carle J., Presser V., Lu J., Hultman L., Gogotsi Y., Barosoum M.W., „Two-dimensional transition metal carbides", *ACS Nano*, 2012, **2** (6), 1322–1331.

44. Naik G.V., Kim J., Boltasseva A., „Oxides and nitrides as alternative plasmonic materials in the optical range", *Opt. Mater. Express*, 2011, **6** (1), 1090–1099.

45. Brzózka Z., Wróblewski W., „Sensory optyczne" w: *Sensory chemiczne*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1999, s. 76–94

46. Lobnik A., Turel M., Korent Urek S., „Optical Chemical Sensors: Design and Applications" w: *Advances in Chemical Sensors*, IntechOpen, Londyn, 2012, 3–28.

47. Oliverio M., Perotto S., Messina G.C., Lovato L., de Angelis F., „Chemical Functionalization of Plasmonic Surface Biosensors: A Tutorial Review on Issues, Strategies, and Costs", *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, **9**, 29394–29411.

4

Sensory gazowe

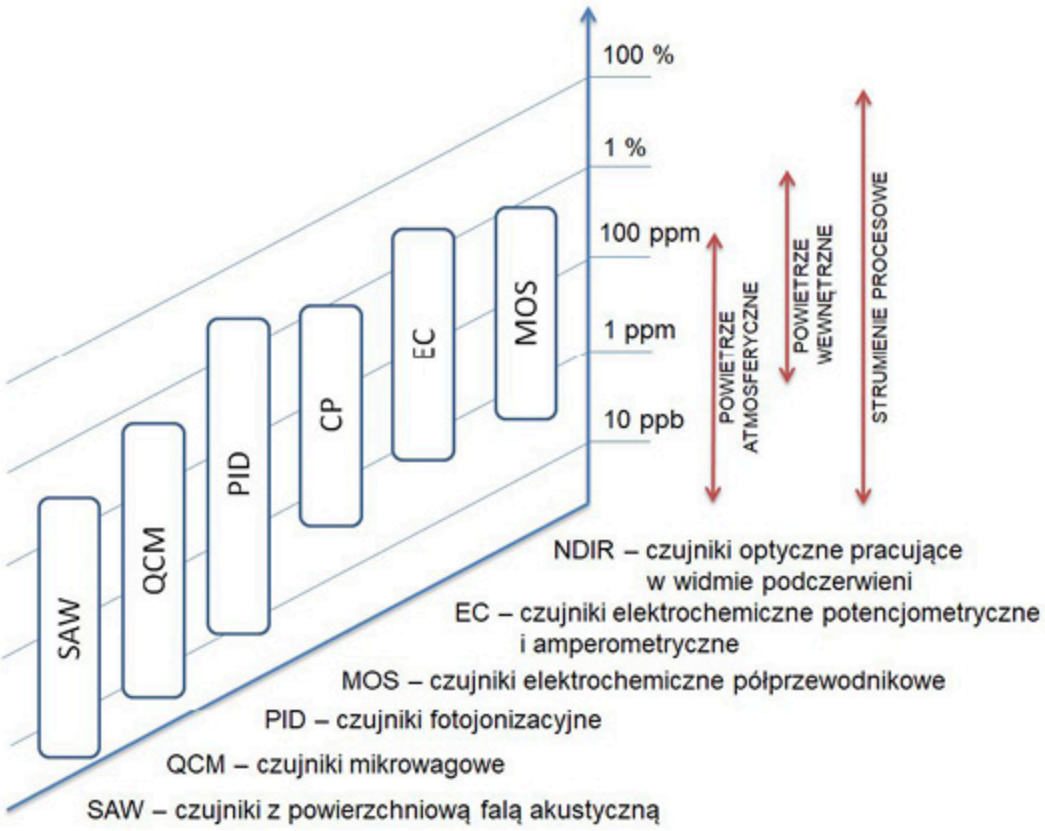
Jacek GĘBICKI, Bartosz SZULCZYŃSKI, Tomasz WASILEWSKI

Czujniki gazowe w stosunku do instrumentalnych metod pomiaru jakości powietrza wewnętrznego oraz zewnętrznego charakteryzują się takimi zaletami, jak: niski koszt, prosta budowa, możliwość miniaturyzacji oraz stosunkowo poprawnymi parametrami metrologicznymi. Mimo jeszcze wielu ograniczeń, te zalety uczyniły czujniki gazowe nie tylko alternatywą w stosunku do instrumentalnych metod, lecz także przyczyniły się do szerokiego zastosowania w wielu aspektach działalności człowieka. Wybór czujnika gazowego do konkretnej aplikacji zależy od wielu czynników, wśród których należy wymienić: rodzaj identyfikowanego gazu lub mieszaniny gazowej, poziom detekcji, stopień mobilności oraz funkcjonalność. Należy również pamiętać o tym, że o właściwym doborze czujnika decydują jego charakterystyczne parametry metrologiczne, takie jak: granica

wykrywalności/oznaczalności, czułość, selektywność, czas odpowiedzi. Powszechna stosowalność czujników gazowych w monitoringu jakości powietrza atmosferycznego jest wciąż ograniczona ze względu na wysoką granicę wykrywalności, jednak w przypadku pomiarów emisyjnych, pomiarów w gazach spalinowych, pomiarach w powietrzu wewnętrznym czy na stanowiskach pracy zastosowania czujników gazowych wciąż rosną. Na rysunku 4.1 w sposób poglądowy przedstawiono obszar zastosowania różnych czujników gazowych w zależności od stężenia gazu w powietrzu atmosferycznym czy powietrzu wewnętrznym.

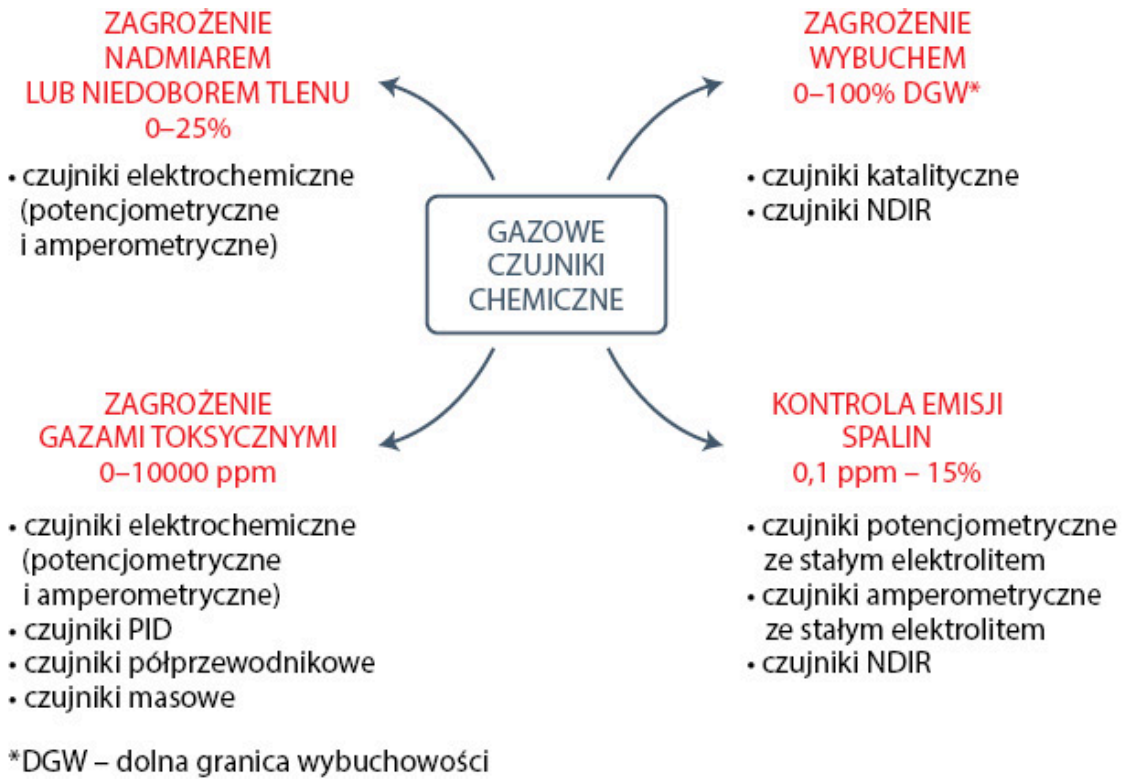
Obecny trend dotyczący technologii wytwarzania czujników gazowych obejmuje cztery główne kategorie identyfikacji składników gazowych, które przedstawiono na rys. 4.2. Należą do nich:

a) zagrożenia gazami toksycznymi – poziom stężeń w zakresie od ok. 1 ppb do ok. 1%,
b) zagrożenia wybuchem – poziom stężeń w zakresie od 0 do 100% dolnej granicy wybuchowości,
c) zagrożenia niedoborem lub nadmiarem tlenu – poziom stężeń w zakresie od 0 do 25%,
d) kontrola emisji spalin – poziom stężeń w zakresie od ok. 0,1 ppm do ok. 15%.



RYS. 4.1

Obszar zastosowania różnych typów czujników gazowych



RYS. 4.2

Kategorie identyfikacji składników gazowych przez czujniki chemiczne

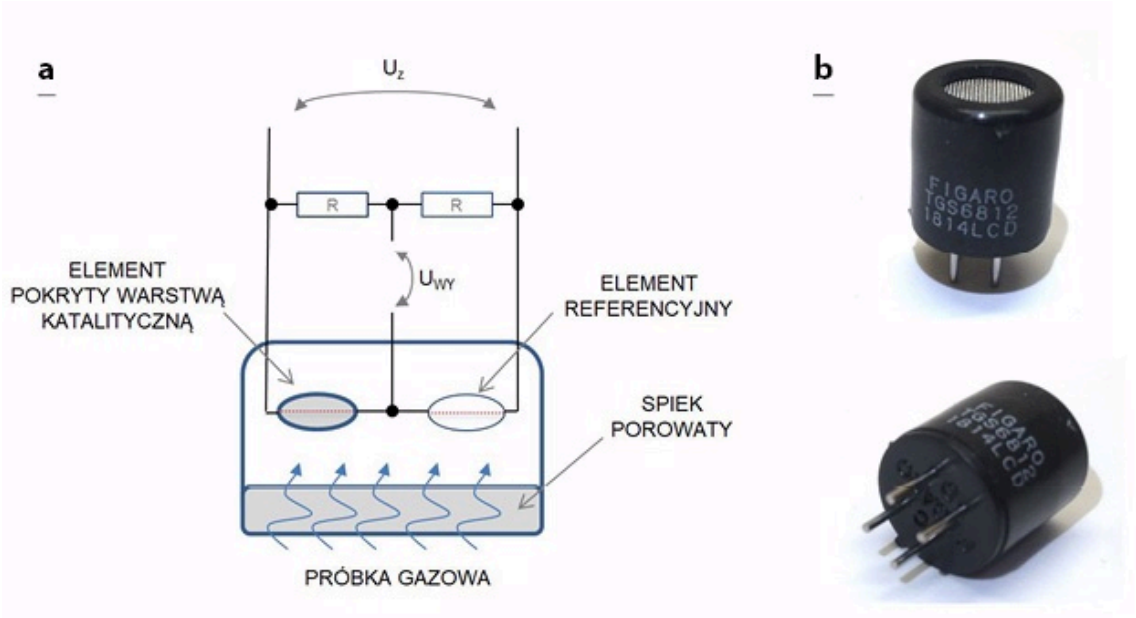
Bogata oferta rynkowa różnego rodzaju czujników gazowych przeznaczonych do detekcji: gazów toksycznych, gazów palnych, niedoboru lub nadmiaru tlenu w powietrzu oraz kontroli zawartości tlenu w emisji spalin świadczy o tym, że czujniki te charakteryzują się stosunkowo dużą funkcjonalnością. W związku z powyższym można uznać, że nie tylko istnieje zapotrzebowanie na tanie urządzenia pomiarowe, lecz także istnieje zapotrzebowanie na dalszy rozwój w kierunku poprawy parametrów metrologicznych, miniaturyzacji, szybkości działania i długiego czasu użytkowania.

Poniżej przedstawiono i opisano zasadę działania najbardziej popularnych czujników gazowych stosowanych w praktyce

laboratoryjnej, a przede wszystkim w różnych sektorach działalności człowieka.

4.1
Katalityczne (temperaturowe) czujniki gazowe

Zasada działania czujników katalitycznych jest oparta na procesie utleniania gazów palnych na powierzchni warstwy katalizatora [1]. Czujnik jest zbudowany z dwóch elementów (rys. 4.3.).



RYS. 4.3

Gazowy czujnik katalityczny: a) schemat budowy czujnika, b) komercyjnie dostępny czujnik katalityczny Figaro TGS6812

Każdy element składa się z bardzo cienkiej cewki wykonanej z drutu platynowego osadzonego w ceramicznym koraliku. Powierzchnia jednego z elementów jest pokryta warstwą katalityczną (najczęściej warstwą metalu szlachetnego). Element z warstwą katalityczną to pelistor. W wyniku przepływu prądu przez drucik platynowy, nagrzewają się elementy ceramiczne. Mieszanina powietrza i gazu palnego dyfunduje poprzez porowaty spiek w kierunku elementów czujnika. W obecności łatwopalnego gazu gorąca warstwa katalizatora umożliwia jego utlenianie. W wyniku tej reakcji jest uwalniane ciepło, które powoduje wzrost temperatury drucika platynowego i zarazem wzrost jego rezystancji. Wzrost temperatury jest miarą stężenia palnej substancji gazowej. Czujniki katalityczne są zawsze wyposażone w dwa elementy: aktywny element pokryty warstwą katalizatora oraz element, który nie zawiera katalizatora, aby żaden gaz nie utleniał się na jego powierzchni. Ten element służy jako rezystancja odniesienia, która jest stosowana w celu usunięcia wpływu czynników środowiskowych innych niż obecność łatwopalnego gazu. Ze względu na obecność dwóch elementów, czujniki katalityczne pracują w układzie mostka Wheatstone'a (jako jedno jego ramię). Sygnał mostka jest proporcjonalny do szybkości i ciepła reakcji:

$$U = K\left(\frac{\mathrm{d}C}{\mathrm{d}t}\right)\Delta H \tag{4.1}$$

gdzie:

U – wyjściowy sygnał napięciowy mostka,

dC/dt – szybkość reakcji katalitycznej,

ΔH – ciepło reakcji,

K – stała proporcjonalności obejmująca pojemność cieplną pelistora i utratę ciepła na skutek konwekcji.

Czujniki katalityczne są głównie wykorzystywane do określania stężeń gazów palnych oraz ich dolnej granicy wybuchowości (DGW). Zjawisko wybuchu może zostać zainicjowane w mieszaninie gazu palnego i powietrza tylko w ściśle określonym zakresie stężeń. Dolna granica wybuchowości określa minimalne stężenie substancji, która może reagować w szybkim procesie spalania. Górna granica wybuchowości (GGW) określa maksymalną ilość paliwa, przy której mieszanina zawiera dostateczną ilość utleniacza, aby zainicjować wybuch. Wartości DGW i GGW są różne dla różnych substancji i są zwykle wyrażane w odniesieniu do powietrza. Stężenia substancji wybuchowych poniżej DGW i powyżej GGW pozwalają na bezpieczną eksploatację. Czujniki katalityczne są głównie wykorzystywane do określania zakresu od 0 do 100% osiągnięcia dolnej granicy wybuchowości. Większość czujników katalitycznych jest kalibrowana na zakres 0–100% DGW dla metanu lub *n*-pentanu. W przypadku wykorzystania czujnika do określania granicy wybuchowości dla innego gazu, należy skorzystać ze współczynników korekcyjnych. Wartości współczynników oraz wartości DGW dla wybranych gazów zestawiono w tabeli 4.1.

TABELA 4.1

Wartości dolnej granicy wybuchowości oraz współczynników korekcyjnych dla wybranych gazów [2]

Związek chemiczny	Dolna granica wybuchowości (DGW) w powietrzu, % v/v	Współczynnik korekcyjny względem metanu	Współczynnik korekcyjny względem *n*-pentanu
aceton	2,5	1,6	0,9
acetylen	2,5	1,7	0,8
amoniak	15,0	0,6	0,35
butan	1,9	1,6	0,8
cykloheksan	1,0	2,0	0,9
etanol	3,3	1,85	0,6
metan	4,4	–	0,5
metanol	6,0	1,2	0,5
n-pentan	1,5	1,9	–
propan	2,1	1,3	0,65
styren	1,0	8,0	4,0
tlenek etylenu	2,6	1,8	0,9
toluen	1,1	1,9	1,1
wodór	4,0	1,2	0,6

Wśród zalet czujników katalitycznych należy wskazać stabilność działania, niskie koszty, krótki czas reakcji i regeneracji oraz wysoką specyficzność dla gazów palnych. Wadą jest niewątpliwie praca w wysokiej temperaturze (duże zużycie energii, możliwość przepalenia drucika), podatność na zatrucie warstwy katalitycznej oraz brak selektywności.

Czujniki katalityczne znalazły zastosowanie przede wszystkim w przemyśle górniczym i wydobywczym, rafineryjnym i petrochemicznym, a także w gazownictwie. Ich głównym zadaniem jest monitorowanie atmosfery w strefach zagrożonych wybuchem.

Na rynku obecnych jest wielu producentów czujników katalitycznych, m.in. Dräger, Figaro, Gastec, SGX Sensortech.

Znakomita większość czujników jest przeznaczona do określania zakresu od 0 do 100% dolnej granicy wybuchowości metanu w jego mieszaninie z powietrzem.

4.2
Masowe czujniki gazowe

Podstawą działania tego typu czujników jest zmiana częstotliwości spowodowana zmianą masy zaadsorbowanej na powierzchni czujnika lub zaabsorbowanej w warstwie naniesionej na jego powierzchnię. Wyróżnia się dwa typy czujników masowych [3]:

- mikrowagi kwarcowe (*quartz crystal microbalance*, QMC),
- czujniki z akustyczną falą powierzchniową (*surface acoustic wave*, SAW).

4.2.1
Mikrowagi kwarcowe

Mikrowagi są zbudowane z rezonatora kwarcowego, na powierzchni którego jest osadzona warstwa chemoczuła, umożliwiająca sorpcję cząsteczek gazu (rys. 4.4). W wyniku tego procesu zwiększa się masa czujnika, co powoduje obniżenie jego częstotliwości rezonansowej. Zmianę częstotliwości, będącą odpowiedzią czujnika, opisuje wzór Sauerbreya:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}}\Delta m = \frac{2f_0^2}{A\rho_q v_q}\Delta m \qquad (4.2)$$

gdzie:

Δf – zmiana częstotliwości,

f_0 – początkowa częstotliwość rezonansowa czujnika,

Δm – zmiana masy,

A – aktywna powierzchnia mikrowagi,

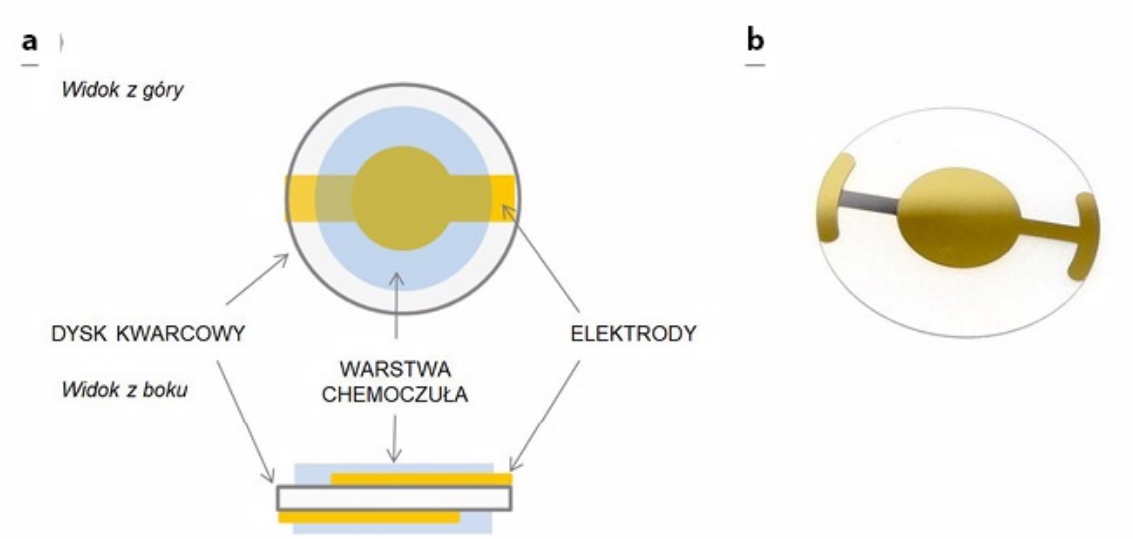
ρ_q – gęstość kwarcu (2,648 g/cm^3),

v_q – prędkość fali poprzecznej w kwarcu,

μ_q – moduł ścinania dla kwarcu (2,947·10^{11} g/cm·s^2 dla cięcia AT).

Wzór Sauerbreya ma zastosowanie w przypadku pracy czujnika w środowisku gazowym. Jeżeli czujnik pracuje w cieczy, zastosowanie ma wzór Kanazawy.

Parametry metrologiczne mikrowag kwarcowych zależą głównie od rodzaju warstwy chemoczułej umieszczonej na powierzchni czujnika. Warstwę chemoczułą stanowi zazwyczaj odpowiednio dobrany polimer. To ona determinuje czułość, selektywność czy specyficzność czujnika. Grubość warstwy chemoczułej mikrowag kwarcowych wynosi około 10–1000 nm. Warstwa ta jest zazwyczaj nanoszona poprzez napylanie, powlekanie obrotowe (*spin-coating*) lub zanurzeniowe (*dip-coating*). Czułość zależy również od częstotliwości pracy i pola powierzchni rezonatora – wzrost częstotliwości rezonansowej i zmniejszenie aktywnej powierzchni mikrowagi powoduje wzrost czułości.



RYS. 4.4

Gazowy czujnik mikrowagowy: a) schemat budowy czujnika, b) komercyjnie dostępny dysk kwarcowy o częstotliwości rezonansowej 10 MHz, Novaetech, Włochy

Poprzez dobór odpowiedniej warstwy chemoczułej, mikrowagi kwarcowe wykazują bardzo niskie granice detekcji oraz stosunkowo dużą selektywność, przy bardzo krótkim czasie odpowiedzi, wynoszącym zazwyczaj 10–60 sekund.

Składnikami warstwy chemoczułej są zazwyczaj polimery, takie jak polianilina, poli(etylenoimina) czy poli(*N*,*N*-dimetyloakrylamid). Często, w celu zwiększenia powierzchni właściwej warstwy, polimery są dodatkowo osadzane na porowatych warstwach nieorganicznych, takich jak tlenek glinu. Szerokie zastosowanie w tworzeniu warstw chemoczułych znalazły również polimery drukowane molekularnie (*molecularly imprinted polymers*, MIPs), których zastosowanie zwiększa selektywność czujników. Dzięki pokryciu warstwy czujnika złotem, możliwe jest tworzenie wiązań kowalencyjnych z atomem siarki. Takie połączenie umożliwia tworzenie warstw chemoczułych z biomolekuł, np. polipeptydów czy nawet białek. Warstwy

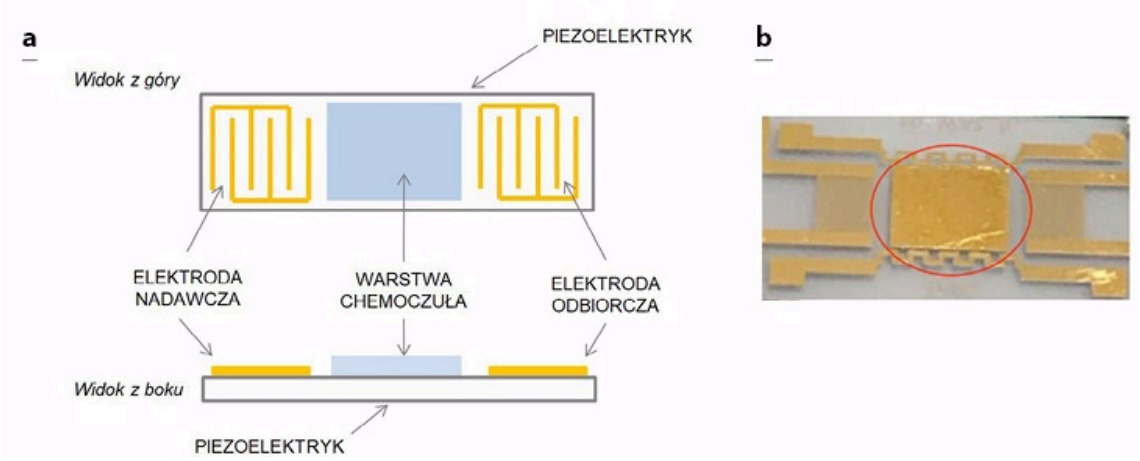
chemoczułe są również tworzone przez materiały absorbujące cząsteczki gazu, takie jak ciecze jonowe. Wraz z rozwojem nanotechnologii, zostały opracowane również warstwy chemoczułe złożone z nanocząstek, nanodrutów czy nanorurek.

Pomimo wielu zalet czujników mikrowagowych, wadami tego rodzaju urządzeń są: skomplikowany proces produkcji uniemożliwiający powtarzalność wykonywania czujników oraz niski stosunek sygnału do szumu. Dodatkową wadą jest duży wpływ temperatury i wilgotności na odpowiedź czujnika oraz skomplikowany układ pomiarowy.

Ze względu na niską powtarzalność czujników mikrowagowych i wysoką wrażliwość na zmiany warunków pomiarowych, nie znalazły one szerokiego zastosowania przemysłowego. Wykorzystuje je się głównie w badaniach laboratoryjnych i pracach badawczo-rozwojowych.

4.2.2
Czujniki z akustyczną falą powierzchniową

Zasada działania tego typu czujników jest oparta na zmianie prędkości akustycznej fali powierzchniowej spowodowanej sorpcją cząsteczek gazu w warstwie chemoczułej. Budowę czujnika z akustyczną falą powierzchniową (*surface acoustic wave*, SAW) przedstawiono na rys. 4.5.



RYS. 4.5

Gazowy czujnik z akustyczną falą powierzchniową: a) schemat budowy czujnika, b) prototyp czujnika przeznaczony do rozróżniania czerwonych win, Bio-Medical Thermo-Fluidics Laboratory, Tajwan

Czujnik zbudowany z piezoelektrycznego podłoża, na którym są umieszczone dwie elektrody (nadawcza i odbiorcza). Pomiędzy elektrodami znajduje się warstwa chemoczuła. Do elektrody nadawczej jest przykładany zmienny sygnał elektryczny, który wytwarza powierzchniową falę akustyczną propagującą po powierzchni piezoelektryka z częstotliwością pomiędzy 100–400 MHz.

Wzrost masy na powierzchni czujnika wpływa na powierzchniową falę akustyczną, gdy przemieszcza się ona przez warstwę chemoczułą. Rejestrowaną zmianę częstotliwości można opisać równaniem:

$$\Delta f = \frac{\Delta f_{\mathrm{p}} c_{\mathrm{v}} K_{\mathrm{p}}}{\rho_{\mathrm{p}}} \tag{4.3}$$

gdzie:

Δf_p – zmiana częstotliwości spowodowana naniesieniem warstwy chemoczułej,

Δf – zmiana częstotliwości spowodowana przez zmianę masy w warstwie chemoczułej,

c_v – stężenie gazu,

K_p – współczynnik podziału,

ρ_p – gęstość warstwy chemoczułej.

Prędkość rozchodzenia się fali będzie maleć wraz ze wzrostem masy. Ta zmiana może być mierzona przez zmianę opóźnienia lub przesunięcia fazowego między sygnałami wejściowymi i wyjściowymi. Możliwy jest również pomiar tłumienia sygnału, ponieważ sprzężenie z dodatkową masą powierzchniową zmniejsza energię fali.

Czujniki SAW jako podłoże piezoelektryczne wykorzystują głównie piezoelektryki naturalne, takie jak tlenek cynku czy kwarc. Warstwa chemoczuła jest zazwyczaj wykonana z polimeru lub w postaci ciekłokrystalicznej, podobnie jak w przypadku czujników mikrowagowych. Warto nadmienić, że możliwe jest wykonywanie warstwy chemoczułej z fosfolipidów i kwasów tłuszczowych przy wykorzystaniu techniki Langmuira–Blodgett. Jednak zazwyczaj czujniki typu SAW są wykonywane metodą fotolitografii z natryskowym nanoszeniem filmu warstwy chemoczułej o grubości 20–30 nm [4].

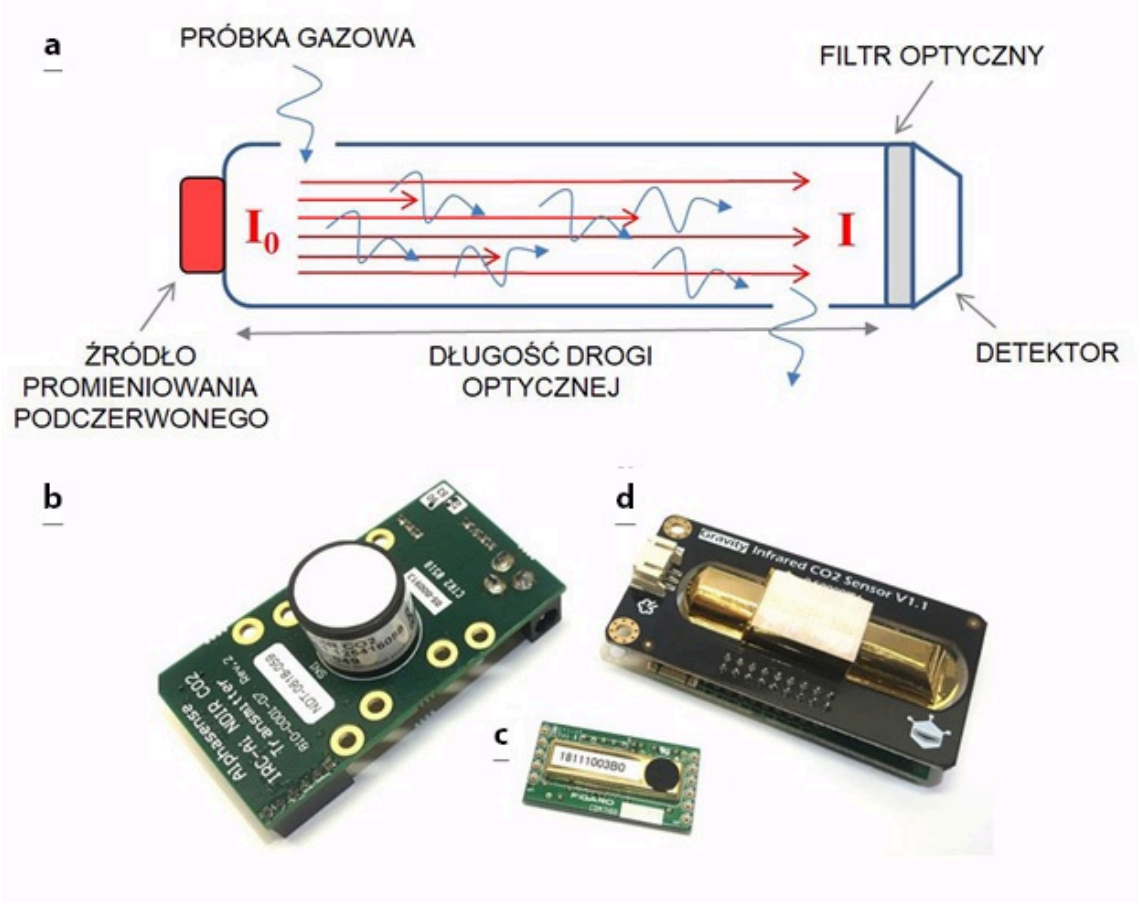
Czułość czujników typu SAW zależy przede wszystkim od rodzaju warstwy chemoczułej. Czujniki typu SAW mogą wykrywać wiele związków chemicznych na niskich poziomach stężeń, co jest ich ogromną zaletą. Niewielki rozmiar oraz niskie zużycie mocy są

również pożądanymi cechami tego typu czujników. Jednak, podobnie jak w przypadku mikrowag, czujniki typu SAW są wrażliwe na zmiany warunków pomiarowych. Istotną wadą jest również stosunkowo niska wartość stosunku sygnału do szumu, która wynika z pracy czujników przy bardzo wysokich częstotliwościach. Skutkuje to również skomplikowaniem układu pomiarowego. Czujniki te znalazły zastosowanie głównie w badaniach laboratoryjnych i pracach badawczo-rozwojowych.

4.3
Optyczne czujniki gazowe

4.3.1
Czujniki pracujące w widmie podczerwieni

Zasada działania czujników pracujących w widmie podczerwieni (*nondispersive infrared*, NDIR) jest oparta na absorpcji promieniowania z zakresu podczerwieni przez cząsteczki gazów. Budowę czujnika przedstawiono na rys. 4.6.



RYS. 4.6

Gazowy czujnik NDIR: a) schemat budowy czujnika, b) komercyjnie dostępny czujnik Alphasense IRC-A1, c) komercyjnie dostępny czujnik Figaro CDM7160, d) komercyjnie dostępny czujnik DFRobot Gravity SEN0219

Czujnik składa się ze źródła promieniowania podczerwonego oraz detektora, który poprzedzony jest odpowiednio dobranym filtrem optycznym. Gdy analizowany gaz pojawia się w komorze pomiarowej, absorbuje promieniowanie o określonej długości fali. Absorpcja promieniowania w średniej podczerwieni, przechodzącego przez próbkę gazu, powoduje rezonans jego cząsteczek z charakterystyczną częstotliwością, zależną od rodzaju wiązania chemicznego. Zgodnie z prawem Lamberta–Beera następuje spadek

promieniowania docierającego do detektora, które jest przekształcane na sygnał elektryczny. Zależność stężenia substancji od zmierzonej absorbancji opisuje wzór:

$$c = \frac{A}{k \cdot l} \tag{4.4}$$

gdzie:

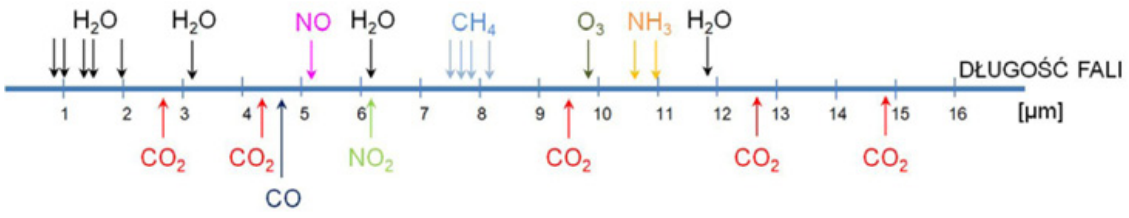
c – stężenie gazu,

A – absorbancja,

k – stała proporcjonalności (molowy współczynnik absorpcji),

l – długość warstwy absorbującej (drogi optycznej).

Absorpcja światła podczerwonego zachodzi przy energii specyficznej dla gazu docelowego, co oznacza wysoką selektywność czujnika do określonego gazu. To najbardziej charakterystyczna cecha czujników gazu NDIR. Na rysunku 4.7 przedstawiono specyficzne zakresy długości fali wykorzystywane do detekcji wybranych gazów.



RYS. 4.7

Zakresy długości fal wykorzystywane do detekcji wybranych gazów w czujnikach NDIR [5]

Do zalet czujników optycznych należy zaliczyć fakt, że narażenie na wysokie stężenie gazu docelowego przez dłuższy czas nie powoduje nieodwracalnego dryftu sygnału. Niektóre konstrukcje czujników NDIR mają dodatkową (referencyjną) komorę, która jest wypełniona gazem optycznie obojętnym (zwykle azotem). W tym przypadku sygnał jest generowany na podstawie różnicy odczytów z detektorów obu komór.

Wraz z rozwojem technik obliczeniowych jako czujniki zaczęto wykorzystywać spektroskopię w podczerwieni z transformatą Fouriera, która w połączeniu z techniką światłowodową umożliwia skanowanie części widna, dokonując analizy wielu gazów absorbujących promieniowanie podczerwone.

Zastosowanie czujników NDIR obejmuje przede wszystkim monitorowanie powietrza atmosferycznego oraz pomiary emisji (CO_2, CO, NO, NO_2, NH_3, CH_4, O_3). Czujniki te, ze względu na bezinwazyjną metodę pomiaru, znalazły również szerokie zastosowanie w monitorowaniu procesów przemysłowych. Są również wykorzystywane w medycynie (pomiary amoniaku, ditlenku węgla w wydychanym powietrzu).

4.3.2
Czujnik fotojonizacyjne

Zasada działania czujników fotojonizacyjnych (*photoionisation detector*, PID) opiera się na jonizacji (rozpadzie na naładowane cząstki) obojętnych cząsteczek związków chemicznych. Proces jonizacji w przypadku czujników PID zachodzi pod wpływem

promieniowania elektromagnetycznego o odpowiednio dobranej energii fotonów. Czujniki PID przeznaczone są głównie do wykrywania lotnych związków organicznych (LZO), dlatego też do ich konstrukcji wykorzystuje się lampy bezelektrodowe (indukcyjne) z zakresu nadfioletu (o długości fali 10–400 nm).

Pobudzony poprzez działanie zewnętrznego pola elektromagnetycznego gaz, wypełniający lampę, emituje promieniowanie o określonej długości fali. Energia emitowanych fotonów zależy od rodzaju stosowanego gazu (tabela 4.2).

TABELA 4.2

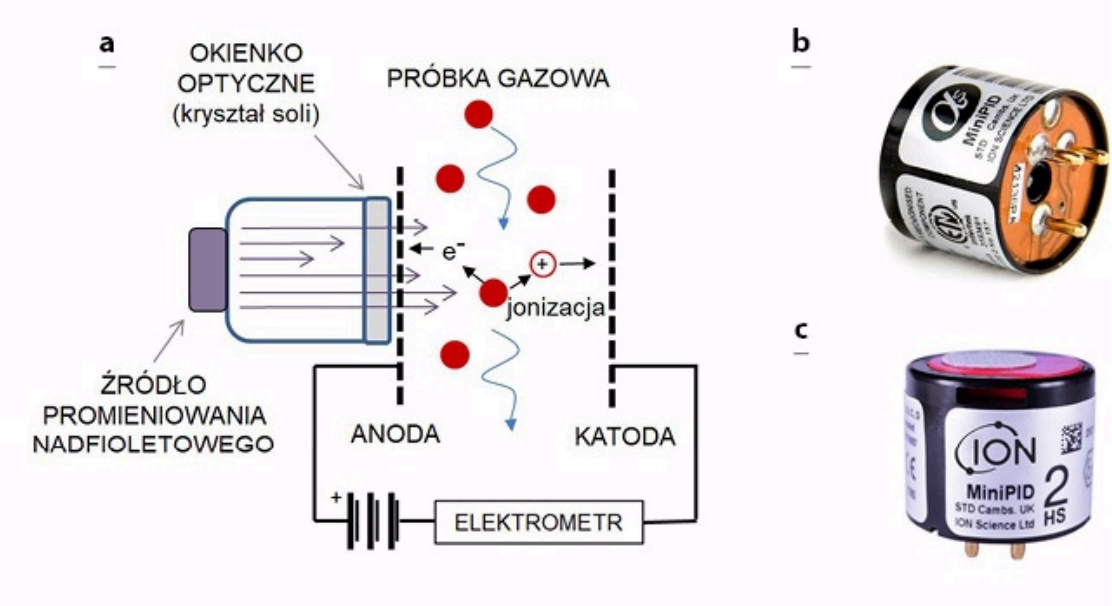
Charakterystyka lamp stosowanych w czujnikach PID [6]

Energia fotonu [eV]	Gaz wypełniający lampę	Długości fali emitowanej [nm]	Związki jonizowane
8,4	ksenon	147,0	naftalen, pinen, dietyloamina
9,5	tlen	130,6 130,5 130,2	etylobenzen, fenol, toluen, benzen
9,6	ksenon	129,6	eter dietylowy, butanon, tetrahydrofuran
10,0	krypton	123,6	aceton, cykloheksan
10,2	wodór	121,6	*n*-butanol, disiarczek węgla, *n*-heptan, octan etylu
10,6	krypton	116,5	amoniak, *n*-heksan, izopentan, siarkowodór
11,7–11,8	argon	106,7 104,8	dinitrobenzen, formaldehyd, metanol

Energia emitowanych fotonów determinuje możliwości zastosowania lampy do wykrywania określonych związków chemicznych.

Schemat czujnika PID przestawiono na rysunku 5.8. Cząsteczki gazu trafiają w region działania lampy. W wyniku działania fotonów emitowanych przez źródło promieniowania są jonizowane. Jonizowane są tylko te gazy, których energia jonizacji jest niższa niż energia fotonu emitowanego przez lampę. Powstałe jony są kierowane pomiędzy dwie spolaryzowane elektrody. W wytworzonym przez elektrometr polu elektrycznym jony poruszają się w kierunku elektrod, powodując przepływ prądu, który następnie jest zamieniany na sygnał napięciowy.

Rejestrowana wartość prądu jest w przybliżeniu liniowo zależna od stężenia gazu w niewielkim zakresie stężeń. Wraz ze wzrostem stężenia następuje wypłaszczenie charakterystyki statycznej czujnika. Komercyjne czujniki PID mają liniową odpowiedź w zakresie ppb i ppm, a zaczynają się nieznacznie odchylać przy około 500 do 1000 ppm izobutylenu. Z tego względu zaleca się wykonanie wzorcowania (kalibracji) przyrządu. Powszechnie używanym gazem do kalibracji czujników fotojonizacyjnych jest izobutylen. Stężenia innych związków chemicznych można wyznaczyć na podstawie znanych współczynników korekcyjnych.



RYS. 4.8

Gazowy czujnik fotojonizacyjny PID: a) schemat budowy czujnika, b) komercyjnie dostępny czujnik Alphasense MiniPID, c) komercyjnie dostępny czujnik ION Science MiniPID2

Główną zaletą czujników PID są ich niewielkie rozmiary (ze względu na stosowanie miniaturowych lamp bezelektrodowych). Natomiast główną niedogodnością ich stosowania jest fakt, że energie fotonów wytwarzanych przez dostępne handlowo lampy pozwalają na jonizację tylko wybranych lotnych związków chemicznych. Dodatkowo, pracujące w czujnikach lampy mają ograniczoną żywotność, przez co duży wpływ na pomiary długookresowe ma dryf linii bazowej. Wśród komercyjnie dostępnych czujników spotkać można lampy o energii jonizacji 9,6; 10,0 oraz 10,6 eV. Czujniki te produkowane są przez Alphasense, ION Science oraz MOCON.

4.4
Elektrochemiczne czujniki gazowe

4.4.1
Czujniki potencjometryczne

Zasada działania gazowego czujnika potencjometrycznego polega na: dyfuzji oznaczanego gazu przez membranę, następnie solwatacji w elektrolicie wewnętrznym i zmianie siły elektromotorycznej (*SEM*) ogniwa złożonego z elektrody wskaźnikowej i elektrody odniesienia. Sygnałem potencjometrycznych czujników gazowych jest wartość *SEM* ogniwa, która się zmienia proporcjonalnie do wartości logarytmu z ciśnienia cząstkowego (p_A) oznaczanego gazu, zgodnie z równaniem:

$$E = E_0 + S \log p_A \tag{4.5}$$

gdzie:

E – siła elektromotoryczna ogniwa,

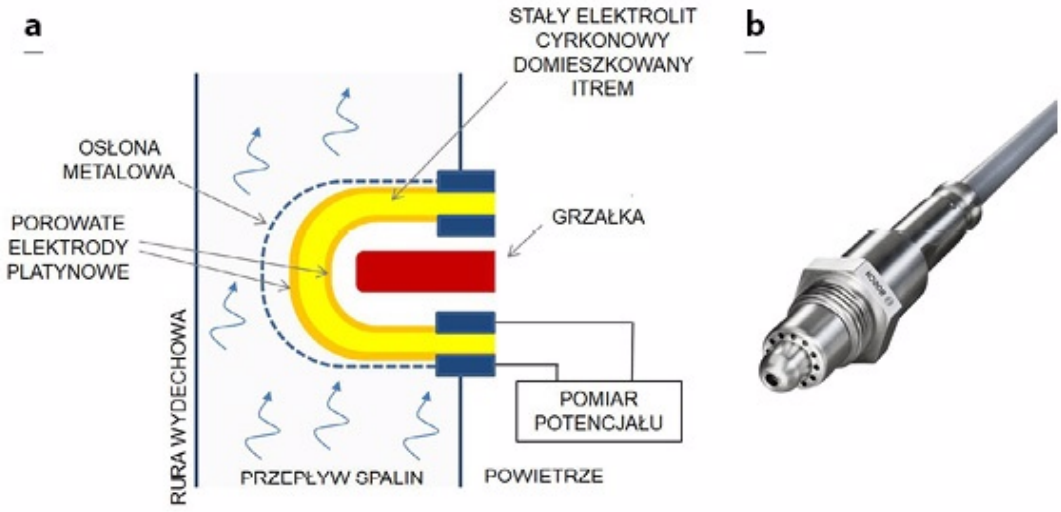
E_0 – siła elektromotoryczna ogniwa dla $p_A = 0$,

S – czułość czujnika.

Teoretyczna czułość większości czujników wynosi 59 mV na 10-krotną zmianę ciśnienia cząstkowego w temperaturze 25°C. Jednak w rzeczywistości czułość czujników potencjometrycznych jest zazwyczaj nieco niższa. Stosunkowo słabe parametry metrologiczne czujników potencjometrycznych z ciekłym elektrolitem są

spowodowane m.in. niską selektywnością oraz dużą wartością stałej czasowej. Jako elektrodę wskaźnikową często stosuje się elektrodę pehametryczną, której potencjał jest uwarunkowany aktywnością jonów hydroniowych, powstałych w wyniku równowagi kwasowo-zasadowej w wewnętrznym elektrolicie takich gazów, jak: SO_2, CO_2, H_2S, NO_2, Cl_2 NH_3. Zastosowanie tych czujników z biegiem lat maleje kosztem gazowych czujników amperometrycznych o zdecydowanie lepszych parametrach metrologicznych.

Natomiast znacznie większe zastosowanie w kontroli emisji spalin znalazły potencjometryczne czujniki ze stałym elektrolitem, a w szczególności czujnik tlenu pracujący jako ogniwo galwaniczne, w którym elektrolitem stałym jest YSZ (*ytrium stabilised zirconium*) ditlenek cyrkonu ZrO_2 domieszkowany tlenkiem itru Y_2O_3. Czujniki te są popularnie nazywane czujnikami lambda. Schematycznie budowę takiego czujnika przedstawiono na rysunku 4.9.



RYS. 4.9

Gazowy czujnik potencjometryczny ze stałym elektrolitem (sonda lambda):

a) schemat budowy czujnika, b) komercyjnie dostępna sonda lambda firmy Bosch

Jedna z elektrod czujnika jest nazywana elektrodą referencyjną, natomiast druga elektrodą wskaźnikową, najczęściej są wykonane z platyny. W ogniwie galwanicznym na powierzchni elektroda/elektrolit stały tworzy się potencjał chemiczny. W przypadku elektrody wskaźnikowej ten potencjał będzie zależał od stężenia tlenu w spalinach, w przypadku elektrody odniesienia potencjał powinien być stały i niezależny od warunków otoczenia. Zwykle potencjał elektrody odniesienia jest ustalany przez umieszczenie tej elektrody w gazie wzorcowym (powietrze atmosferyczne). Stały elektrolit YSZ jest zaliczany do elektrolitów wykazujących bardzo duży udział przewodnictwa jonowego. Tlen w postaci jonów przenika przez stały elektrolit, wykorzystując obecne w jego strukturze jony tlenkowe. Sygnał czujnika zależy od temperatury pomiaru. Z tego względu dla stabilnej pracy tego typu czujników stosuje się układy grzejników o stabilizowanej temperaturze w zakresie 450÷650°C. Zasada działania takiego czujnika polega na wyrównaniu poziomu stężeń tlenu w spalinach i w powietrzu odniesienia. Zaistniałej sytuacji towarzyszy przepływ jonów, powstałych na elektrodach w wyniku następujących reakcji:

$$O_2 \text{ (powietrze atmosferyczne)} + 4e^- \rightarrow 2O^{2-} \text{ (elektrolit stały)}$$

$$2O^{2-} \text{ (elektrolit stały)} \rightarrow O_2 \text{ (spaliny)} + 4e^-$$

tworzy się różnica potencjału zgodnie z równaniem Nernsta:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{p_{O_2\,(\text{spaliny})}}{p_{O_2\,(\text{powietrze atmosferyczne})}}$$

(4.6)

gdzie:

E_0 – siła elektromotoryczna ogniwa w warunkach normalnych (T = 273 K, p = 1 atm),

R – uniwersalna stała gazowa,

T – temperatura,

n – liczba elektronów biorąca udział w reakcji elektrochemicznej,

F – stała Faradaya.

Czujniki tego typu odgrywają bardzo istotną rolę w poprawnej pracy silników samochodowych. Ta poprawna praca zależy od składu mieszanki paliwowej podawanej do komory spalania. Stechiometryczny stosunek ilości powietrza do ilości paliwa wynosi 14,7:1. Produktami spalania są wówczas para wodna i CO_2. Parametrem określającym skład mieszanki jest bezwymiarowy współczynnik AFR (*air to fuel ratio*) wyrażany jako stosunek masy powietrza do masy paliwa:

$$AFR = \frac{\text{masa powietrza}}{\text{masa paliwa}}$$

(4.7)

Jeżeli w mieszance paliwowej jest za dużo powietrza (AFR > 14,7) mamy do czynienia z tzw. mieszanką ubogą. Silnik w takich warunkach pracuje ekonomiczniej, jednakże wadą jest wzrost emisji NO_x. W przypadku tzw. bogatej mieszanki paliwowej (AFR < 14,7)

niezbędnej przy uruchamianiu zimnego silnika, a także przy dużym obciążeniu, następuje wzrost emisji CO i węglowodorów. Stosunek aktualnej wartości AFR do stechiometrycznej wartości AFR (14,7:1) określa względny współczynnik składu mieszanki zwany lambda (λ):

$$\lambda = \frac{\mathrm{AFR}_{(\mathrm{aktualne})}}{\mathrm{AFR}_{(\mathrm{stechiometryczne})}}$$

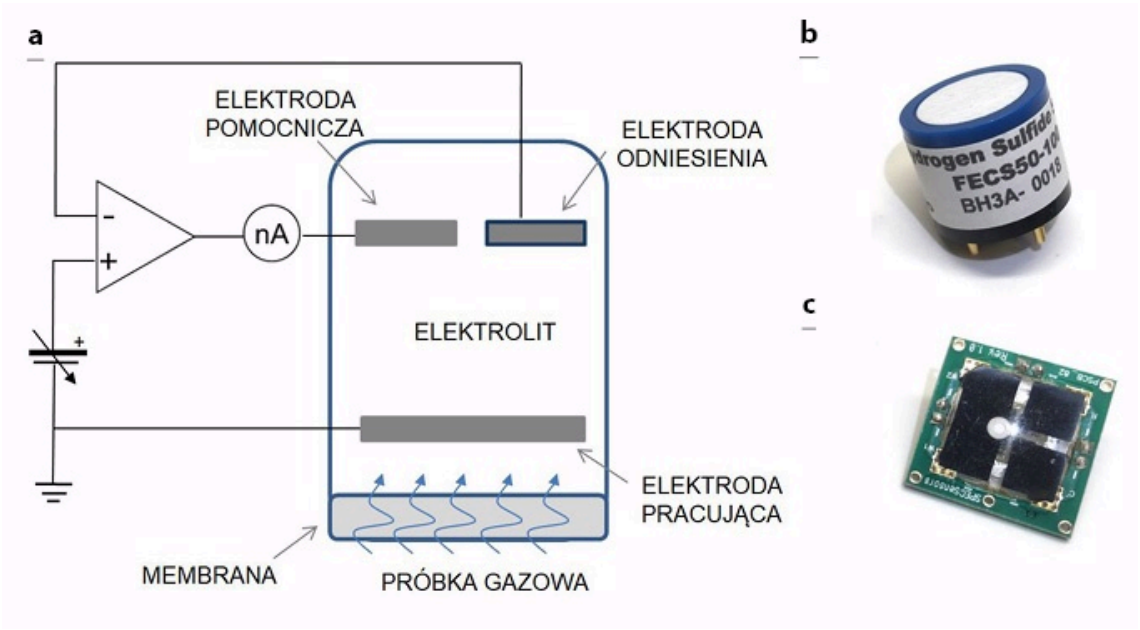
(4.8)

Przy całkowitym (stechiometrycznym) spaleniu mieszanki paliwowej współczynnik λ osiąga optymalną wartość 1. Odchylenia od wartości $\lambda = 1$, czujnik potrafi zidentyfikować i dzięki urządzeniom sterującym automatycznie ustalana jest najkorzystniejsza dla danych warunków pracy silnika wartość AFR. Do głównych zalet czujników potencjometrycznych lambda należy zaliczyć zmniejszenie ilości toksycznych składników emitowanych do powietrza atmosferycznego, a ponadto: prosta budowa, duża dokładność i szybkość działania, umożliwiająca zastosowanie ich bezpośrednio w układach regulacji automatycznej. Czujniki te są produkowane m.in. przez NGK Spark Plug Co. Ltd, Bosch GmbH, Denso Corporation, Delphi Corporation. Alphasense.

4.4.2
Czujniki amperometryczne

W czujnikach amperometrycznych z elektrolitem ciekłym sygnałem czujnika jest natężenie prądu elektrycznego proporcjonalne do stężenia oznaczanego gazu znajdującego się w otoczeniu czujnika.

Czujnik jest zbudowany z trzech elektrod. Jedną z nich jest elektroda pomiarowa (W) inaczej nazywana: pracującą, roboczą, wskaźnikową. Drugą elektrodą jest przeciwelektroda (C). Natomiast trzecią elektrodą jest elektroda odniesienia (R). Elektrody znajdują się w elektrolicie wewnętrznym będącym najczęściej elektrolitem charakteryzującym się dużą przewodnością elektrolityczną. Do tego typu elektrolitów należą wodne roztwory mocnych kwasów lub zasad. Elektrody wraz z elektrolitem wewnętrznym są oddzielone od otoczenia membraną, która stanowi integralną cześć budowy czujnika amperometrycznego. Schemat budowy czujnika amperometrycznego został przedstawiony na rysunku 4.10.



RYS. 4.10

Gazowy czujnik amperometryczny: a) schemat budowy czujnika, b) komercyjnie dostępny czujnik Figaro FECS50-100, c) komercyjnie dostępny czujnik SPEC Sensors 3SP-H2S-50-C

Zasada działania czujnika amperometrycznego polega na transporcie cząsteczek oznaczanego gazu dzięki zjawisku dyfuzji

z otoczenia czujnika poprzez membranę i elektrolit wewnętrzny do powierzchni elektrody pomiarowej odpowiednio spolaryzowanej względem elektrody odniesienia, tak aby zaszła reakcja elektrochemiczna utleniania bądź redukcji w zależności od oznaczanego gazu. Zachodząca na elektrodzie pomiarowej reakcja elektrochemiczna jest bilansowana odpowiednią reakcją elektrochemiczną na przeciwelektrodzie. Efektem zajścia reakcji elektrochemicznej na elektrodzie pomiarowej jest wygenerowanie prądu elektrycznego, którego wartość jest proporcjonalna do stężenia gazu znajdującego się poza czujnikiem amperometrycznym. Równanie 4.9 przedstawia zależność prądu elektrycznego od stężenia mierzonego gazu:

$$I = \frac{nFAC_0 D_{\text{eff}}}{L_{\text{eff}}} \tag{4.9}$$

gdzie:

C_0 – stężenie mierzonego gazu,

A – powierzchnia elektrody pomiarowej,

$D_{\text{eff}}/L_{\text{eff}}$ – stosunek zastępczego współczynnika dyfuzji do całkowitej długości drogi dyfuzji cząsteczek analizowanego gazu z otoczenia czujnika do powierzchni elektrody roboczej,

n – liczba elektronów występujących w stechiometrycznym równaniu reakcji elektrodowej,

F – stała Faradaya.

W tabeli 4.3. przedstawiono natomiast przykładowe reakcje elektrodowe wykorzystywane w czujnikach amperometrycznych do

oznaczania gazów.

TABELA 4.3

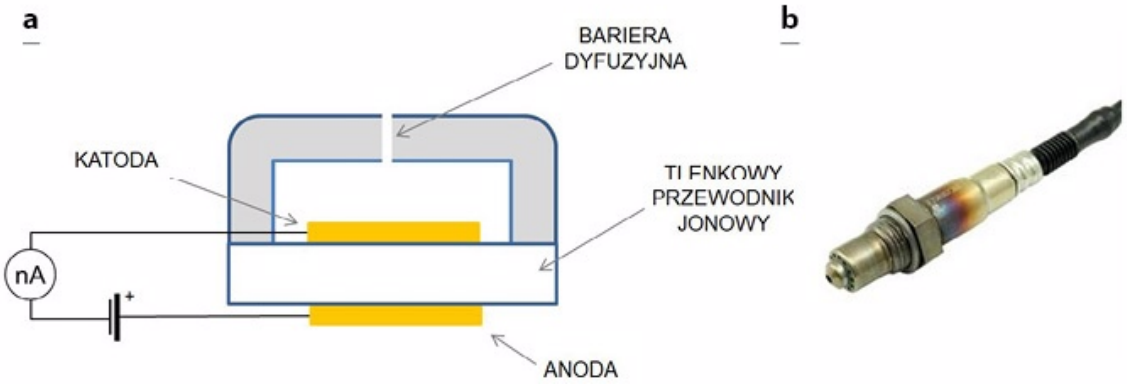
Przykłady reakcji elektrodowych wykorzystywanych w czujnikach amperometrycznych do oznaczania analitów gazowych [7–9]

Lp.	Równanie reakcji	Potencjał względem NHE [V]	Materiał elektrody
1.	$SO_2 + 2\ H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 4\ H^+ + 2\ e^-$	+ 0,17	Pt, Au
2.	$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + 2\ H^+ + 2\ e^-$	- 0,12	Pt
3.	$H_2 \rightarrow 2\ H^+ + 2\ e^-$	0,0	Pt
4.	$NO + 2\ H_2O \rightarrow NO_3^- + 4\ H^+ + 3\ e^-$	+ 0,96	Pt
5.	$H_2S + 4\ H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 10\ H^+ + 8\ e^-$	+ 0,36	Pt
6.	$NO_2 + 2\ H^+ + 2\ e^- \rightarrow NO + H_2O$	+ 1,03	Pt

Czujniki tego typu są powszechnie dostępne. Produkowane są przez takie firmy jak: Figaro, Alphasense, SPEC Sensors, Dräger czy SGX Sensortech.

Czujniki amperometryczne ze stałym elektrolitem najczęściej tlenkowym przewodnikiem jonowym ZrO_2 domieszkowanym Y_2O_3 w przeciwieństwie do czujników amperometrycznych z ciekłym elektrolitem są zbudowane z dwóch elektrod bez elektrody referencyjnej. Zasada działania jest podobna, tylko z tą różnicą, że czujnik pracuje w wysokiej temperaturze. Oznaczany gaz dyfunduje przez barierę dyfuzyjną, która w tym przypadku najczęściej jest pojedynczym otworem wywierconym laserowo, lub warstwą porowatą. Zachodzące na elektrodach w tym przypadku katodzie i anodzie reakcja elektrochemiczna generuje w obwodzie zewnętrznym prąd elektryczny, który zależy od stężenia gazu oraz od wartości napięcia polaryzującego czujnik. Zakres napięcia

polaryzacyjnego powinien być tak dobrany, aby czujnik pracował w takich warunkach, gdzie prąd czujnika nie zależy od wartości napięcia polaryzacyjnego, a jedynie od stężenia oznaczanego gazu. Na rysunku 4.11 przedstawiono w sposób schematyczny budowę czujnika amperometrycznego ze stałym elektrolitem. Czujniki tego typu pracujące w wysokiej temperaturze najczęściej są wykorzystywane w sektorze motoryzacyjnym. Znane są czujniki, które mierzą takie gazy, jak: tlen, ditlenek węgla, węglowodory, tlenki azotu.



RYS. 4.11

Gazowy czujnik amperometryczny z elektrolitem stałym: a) schemat budowy czujnika, b) komercyjnie dostępny czujnik UEGO firmy Bosch

W ostatnim 20-leciu firma Bosch GmbH wprowadziła na rynek do zastosowań samochodowych czujnik, którego zasada działania jest znana zarówno z czujnika potencjometrycznego ze stałym elektrolitem (czujnik lambda), jak i czujnika amperometrycznego z elektrolitem stałym. Czujnik znany jest pod nazwą UEGO (*universal exhaust gas oxygen*) i jest stosowany do regulacji silników benzynowych, na olej napędowy a także na gaz ziemny.

4.4.3
Czujniki półprzewodnikowe (konduktometryczne)

Czujniki półprzewodnikowe (MOS – *metal oxide semiconductor*, *metal oxide sensor*) po raz pierwszy zostały skonstruowane i opatentowane w Japonii w latach 60. XX wieku przez N. Taguchi. Zasada działania tego rodzaju czujników polega na zmianie przewodności (a zarazem rezystancji) powstającej w wyniku oddziaływania substancji gazowej z półprzewodnikowym tlenkiem metalu. W praktyce wykorzystuje się dwa rodzaje półprzewodnikowych tlenków metali:

- tlenki metali przejściowych wykazujące właściwości charakterystyczne dla półprzewodników typu *p* (NiO, MnO, FeO, Co_3O_4);
- tlenki metali przejściowych wykazujące właściwości charakterystyczne dla półprzewodników typu *n* (TiO_2, ZnO, SnO_2).

Wykrywany gaz oddziałuje z powierzchnią warstwy tlenku metalu (na ogół poprzez zaadsorbowane na powierzchni jony tlenu), co powoduje zmianę stężenia nośnika ładunku w materiale. Ta zmiana stężenia nośnika ładunku powoduje zmianę przewodnictwa (i zarazem rezystancji) materiału (tabela 4.4).

TABELA 4.4

Reakcja czujnika półprzewodnikowego wybranego typu na obecność gazu o charakterze utleniającym i redukującym

Rodzaj półprzewodnika	Obecność gazów o charakterze utleniającym	Obecność gazów o charakterze redukującym
Typu *n*	spadek przewodnictwa (wzrost rezystancji)	wzrost przewodnictwa (spadek rezystancji)
Typu *p*	wzrost przewodnictwa (spadek rezystancji)	spadek przewodnictwa (wzrost rezystancji)

W półprzewodniku typu *n* większość nośników ładunku stanowią elektrony, a po interakcji z gazem redukującym następuje wzrost przewodnictwa. I odwrotnie, gaz utleniający służy do zubożenia warstwy czujnikowej elektronów przenoszących ładunek, powoduje to spadek przewodnictwa. Półprzewodnik typu *p* to materiał przewodzący z dodatnimi dziurami elektronowymi. W związku z tym w materiale obserwuje się odwrotne efekty, wykazujące wzrost przewodnictwa w obecności gazu utleniającego (gdzie gaz zwiększył liczbę dodatnich otworów). Obserwuje się wzrost oporu wraz z gazem redukującym, gdzie ładunek ujemny wprowadzony do materiału zmniejsza stężenie nośnika ładunku dodatniego (dziurowego).

Najczęściej występujące czujniki półprzewodnikowe, to czujniki oparte na tlenkach metali typu *n* (głównie SnO_2). Pracują one zazwyczaj w atmosferze powietrza, zawierającej około 21% tlenu. Zasada działania czujników opartych na tlenkach typu *n* wykorzystuje chemisorpcję tlenu z powietrza na powierzchni tlenku metalu, który wychwytuje wolne elektrony z powierzchni i granicy ziaren tlenku metalu. Ten proces zwiększa rezystancję warstwy ze względu na zmniejszenie ilości nośników ładunku (elektronów). W przypadku pojawienia się gazu o charakterze redukującym (H_2, CH_4, CO, C_2H_5, H_2S) opór warstwy zaczyna się zmniejszać, ponieważ gazy te reagują ze związanym atomem tlenu, który wówczas uwalnia

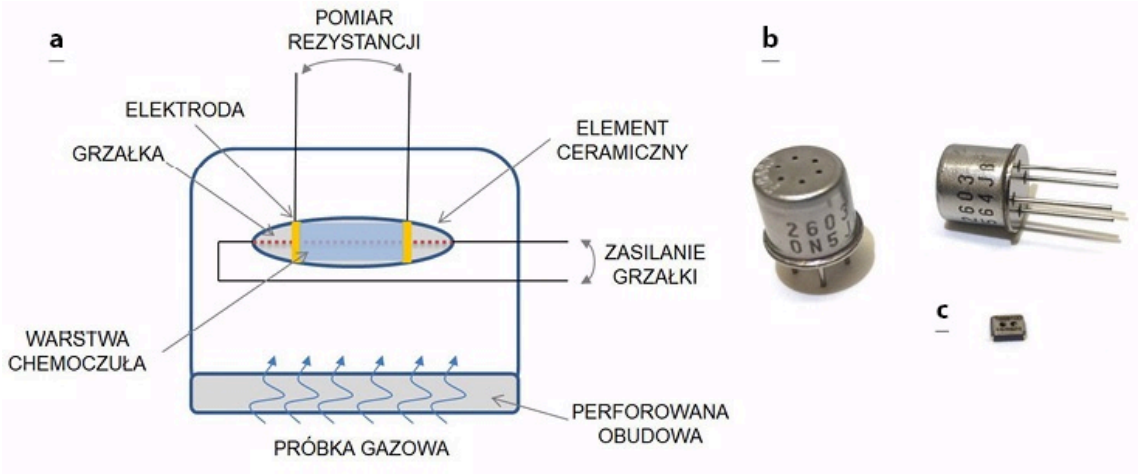
elektrony. Zwiększona ilość nośników ładunku powoduje zmniejszenie bariery potencjału pomiędzy ziarnami półprzewodnika, co skutkuje zmniejszeniem rezystancji warstwy chemoczułej. Równania reakcji zachodzących na powierzchni półprzewodnikowego tlenku metalu przedstawiono poniżej:

$$\frac{1}{2}O_2 + e^- \rightarrow O^-_{(s)}$$

$$R_{(g)} + O^-_{(s)} \rightarrow RO_{(g)} + e^-$$

gdzie $R_{(g)}$ jest gazem redukującym, natomiast indeksy (g) i (s) odnoszą się odpowiednio do fazy gazowej i powierzchni czujnika.

Wytwarzanie czujników typu MOS opiera się głównie na nanoszeniu cienkich warstw materiałów na wcześniej odpowiednio dobrane podłoże ceramiczne. Do tego celu wykorzystuje się następujące metody: sitodruk, powlekanie obrotowe lub chemiczne osadzanie z fazy gazowej. Tymi samymi metodami nanosi się również elektrody, które zazwyczaj są wykonane ze złota, platyny, srebra lub glinu. Elementy grzewcze są zazwyczaj nanoszone z drugiej strony podłoża ceramicznego, aby zapewnić odpowiednią temperaturę pracy czujnika (200–500°C). Budowę czujnika typu MOS przedstawiono na rysunku 4.12.



RYS. 4.12

Gazowy czujnik półprzewodnikowy: a) schemat budowy czujnika, b) komercyjnie dostępny czujnik Figaro TGS2603, c) komercyjnie dostępny czujnik Figaro TGS8100 produkowany w technologii MEMS

Nanoszone warstwy chemoczułe w przypadku czujników typu MOS mają grubość 10–300 μm (dla warstw grubych) lub 6–1000 nm (dla tzw. cienkich filmów). Warstwy te są często wzbogacane poprzez umieszczenie na ich powierzchni atomów metali, charakteryzujących się właściwościami katalitycznymi. Ten zabieg powoduje wzrost czułości na określone wybrane rodzaje gazów. Do domieszkowania warstw tlenkowych stosuje się głównie Pt, Pd, Ag, Sb, Cd.

Dotychczas nie udało się opracować uniwersalnego modelu działania półprzewodnikowych czujników gazu, gdyż zachowanie się czujnika w głównej mierze zależy od rodzaju materiału, jego właściwości fizykochemicznych, zastosowanych domieszek i konstrukcji czujnika. Duży wpływ na sygnał czujnika ma również zawartość pary wodnej w badanej próbce. Opracowano wiele modeli, opisujących związek przewodnictwa czujnika ze stężeniem

substancji wykrywanej. Najbardziej uniwersalny przedstawiono poniżej:

$$\sigma = Ac^{\beta} \tag{4.10}$$

Gdzie:

σ – konduktywność (przewodnictwo),

A, β – stałe charakterystyczne dla czujnika i wykrywanego gazu.

W przypadku czujników typu MOS czułość (S) wyznacza się przez stosunek:

$$S = \frac{\frac{\Delta R}{R_0}}{c_g} \tag{4.11}$$

gdzie:

R – rezystancja rejestrowana w przypadku obecności substancji gazowej w otoczeniu czujnika,

R_0 – rezystancja linii bazowej czujnika,

c_g – stężenie substancji zapachowej w otoczeniu czujnika.

Wykazano, że odpowiedź czujnika zależy od dużej ilości czynników, przez co stosunkowo łatwe jest kształtowanie ich właściwości w bardzo szerokim zakresie, głównie poprzez domieszkowanie warstwy półprzewodnikowej oraz regulację parametrów pracy (głównie temperatury). Uzyskana czułość zależy przede wszystkim od grubości warstwy chemoczułej (wzrost

grubości warstwy powoduje spadek czułości), temperatury pracy czujnika oraz od rozmiaru ziaren osadzanego tlenku półprzewodnikowego.

Istotnym parametrem pracy czujników półprzewodnikowych jest czas odpowiedzi i czas powrotu sygnału do stanu początkowego (tzw. czas regeneracji). Średni czas odpowiedzi czujników typu wynosi od 5 do 60 sekund. Natomiast czas regeneracji to około 15–180 sekund [10].

Krótki czas odpowiedzi i regeneracji to główne zalety stosowania czujników półprzewodnikowych. Spośród pozostałych należy wymienić również niewielkie rozmiary, niskie koszty wytworzenia i możliwość bezpośredniego umieszczenia na pomiarowym układzie elektronicznym. Obecnie czujniki półprzewodnikowe są również produkowane w technologii MEMS, co spowodowało miniaturyzację komercyjnie dostępnych urządzeń. Pomimo dużej ilości zalet, czujniki półprzewodnikowe charakteryzuje bardzo wysoka czułość na etanol, co uniemożliwia zidentyfikowanie pozostałych składników próbki. Ponadto czujniki MOS są podatne na nieodwracalne zatrucia poprzez wiązanie związków siarki. Wadą może być również bardzo wysoka temperatura pracy, która generuje wysokie zużycie energii elektrycznej. Dodatkowo wysoka temperatura pracy uniemożliwia wykorzystanie czujników półprzewodnikowych przy analizie mieszanin wybuchowych.

Dostępna jest szeroka gama czujników półprzewodnikowych produkowanych przez firmy takie jak: Figaro, SGX Sensortech, Aeroqual, AppliedSensor.

4.5
Czujniki gazowe wykorzystujące nanomateriały

Przedrostek „nano-” wywodzi się z greckiego słowa „nanos” – karzeł i definiuje wielkość elementów strukturalnych nanomateriałów, które powinny być mniejsze niż 100 nm [11, 12]. Ograniczenie rozmiaru materiałów do skali nano sprawia, że można im przypisać właściwości, które nie występują dla elementów w skali mikro i makro. Za symboliczny początek rozwoju nanotechnologii jako dziedziny nauki uważa się rok 1959 i wykład amerykańskiego fizyka, Richarda Feynmana pt. „Plenty of Room at the Bottom”, który rok później przedstawił swoje tezy w artykule pt. „There’s Plenty of Room at the Bottom” [13]. Wykazanie nowych możliwości ukrytych w technikach dających możliwości manipulowania strukturami w skali nano, zapoczątkowały prężny rozwój tej dyscypliny naukowej. Nowoczesne czujniki gazowe i systemy czujnikowe odniosły ogromne korzyści dzięki postępom w mikroelektronice i mikroinżynierii, kolejnym krokiem milowym w zakresie rozwoju czujników jest stopniowe wdrażanie nanotechnologii do projektowania czujników gazowych [14]. Rozwój jest ukierunkowany na opracowanie czujników, które przezwyciężają ograniczenia urządzeń komercyjnych, zwłaszcza w zakresie zwiększania selektywności, zmniejszania zużycia energii oraz wykrywania gazów, których identyfikacja jest utrudniona za pomocą klasycznych technik analizy gazów. Równolegle, rośnie zainteresowanie technologiami

syntezy, charakterystyki i produkcji nanomateriałów, które umożliwią prostszą i tańszą produkcję czujników gazowych na ich bazie.

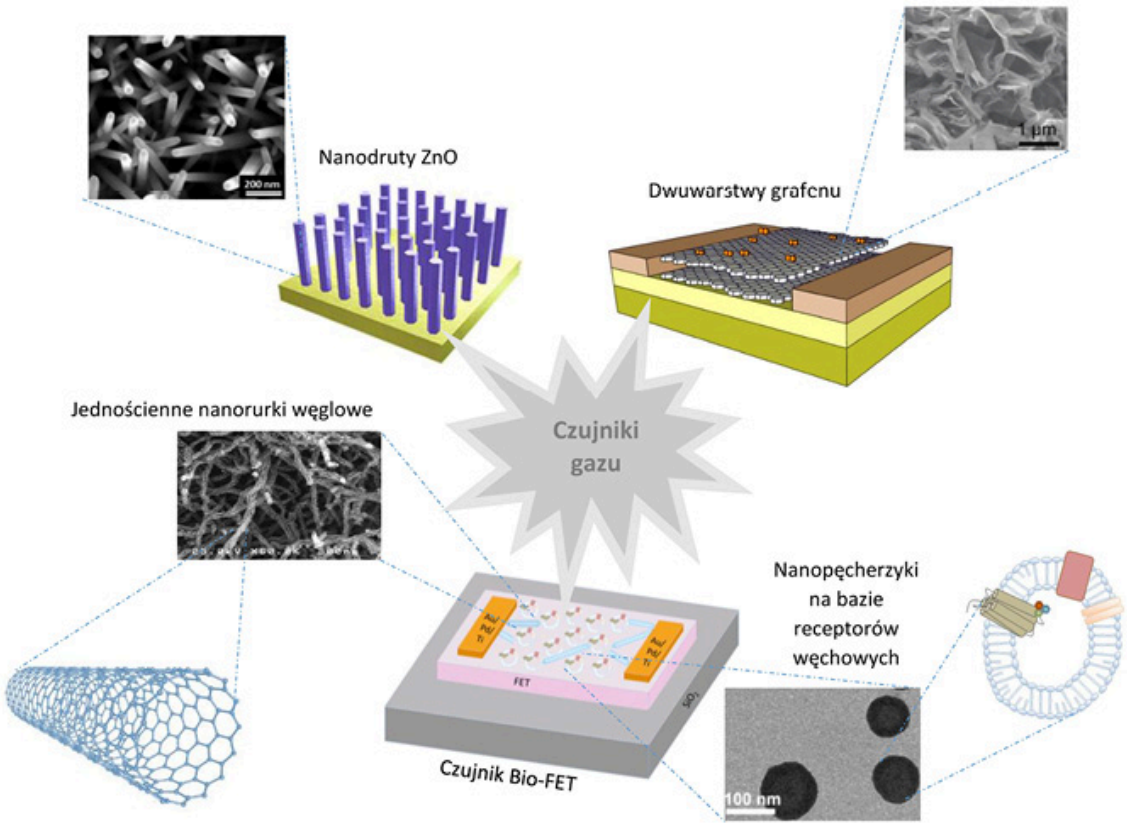
Głównym problemem czujników gazowych ogólnego przeznaczenia jest brak selektywności w stosunku do wybranych substancji gazowych. Istnieje kilka strategii poprawy selektywności czujników gazowych, m.in. zastosowanie funkcjonalizacji powierzchni, cykliczne zmiany temperatury, zastosowanie materiałów wieloskładnikowych czy też domieszkowanie nanomateriałami. Powszechna miniaturyzacja czujników gazowych wymaga opracowania adekwatnych i kompatybilnych technologii wykorzystujących nanomateriały. Materiał receptorowy użyty do budowy czujnika odgrywa kluczową rolę w jego użyteczności w docelowym zastosowaniu. Nowe trendy w konstrukcji czujników gazowych obejmują wdrażanie do ich budowy różnego typu nanomateriałów. Jako kryterium ich podziału można przyjąć liczbę wymiarów mierzonych w nanometrach [15]. Taka klasyfikacja obejmuje materiały:

- ograniczone w trzech wymiarach, struktura typu zerowymiarowego (0D – *zero-dimensional*); przykłady: nanocząstki, nanopory, kropki kwantowe, fulereny;
- ograniczone w dwóch wymiarach, struktura typu jednowymiarowego (1D); przykłady: nanorurki, nanowłókna, nanodruty, nanopręty;
- ograniczone w jednym wymiarze, struktura typu dwuwymiarowego (2D); przykłady: materiały cienkowarstwowe, tj. monowarstwy, nanowarstwy, nanopłytki, filmy typu Langmuira–Blodgett.

Właściwości materiałowe różnych struktur w nanoskali (rys. 4.13) objawiają się obecnością zjawisk kwantowych, które wpływają na

chemiczne, fizyczne i biologiczne właściwości nanomateriałów. Atomy występujące w wymienionych strukturach, to w większości atomy powierzchniowe, co znacznie zwiększa efektywną powierzchnię dostępną do reakcji. Zwiększenie stosunku pola powierzchni do masy lub objętości, występujące wraz ze zmniejszeniem uziarnienia ma istotny wpływ na potencjalne zastosowania, głównie w katalizie i chemicznym wykrywaniu gazów [16]. Różne rodzaje nanomateriałów i nanostruktur są rozpatrywane do opracowywania czujników gazowych, głównie należą do nich:

- nanomateriały na bazie węgla,
- nanomateriały na bazie tlenków metali,
- nanomateriały na bazie polimerów,
- nanomateriały biologiczne,
- nanocząstki metali,
- kompozyty hybrydowe i inne.



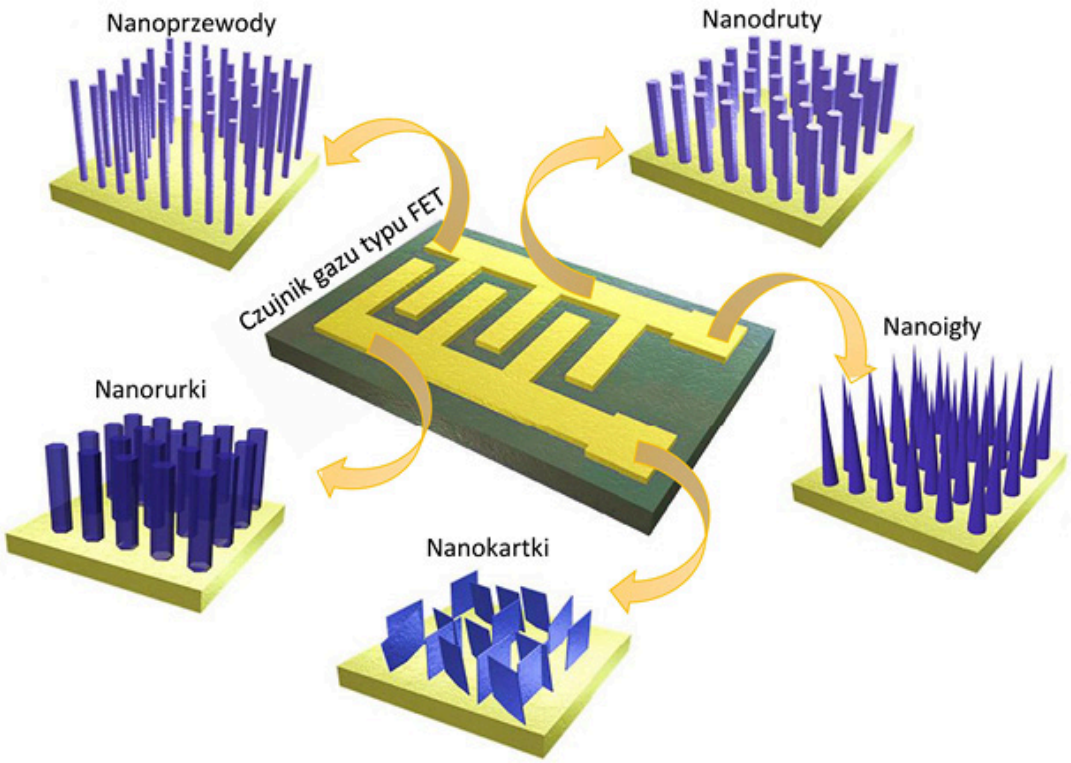
RYS. 4.13

Przykłady nanomateriałów wdrażanych do budowy czujników gazowych

4.5.1 Nanomateriały półprzewodnikowe na bazie tlenków metali

W porównaniu z innymi materiałami czujnikowymi, półprzewodnikowe tlenki metali (MOS) zapewniają wysoką stabilność, trwałość i czułość na stężenia analitów poniżej ppm. Uzyskanie niższej granicy oznaczalności jest możliwe dzięki dostrojeniu parametrów MOS, takich jak ich skład, kształt,

morfologia, poziom domieszkowania, powierzchnia aktywna, temperatura pracy i wpływ na wilgotność. Struktury MOS o dużych powierzchniach i małych objętościach wykazują znaczną poprawę w wykrywaniu LZO. Postępy w zakresie technik wytwarzania umożliwiły tworzenie nanokompozytów i cienkich warstw MOS o grubości kilku nanometrów (struktury 1D i 2D), które pozwalają na konstrukcję bardzo czułych, szybkich i kompaktowych urządzeń do detekcji i monitorowania substancji gazowych [18, 19]. Tlenki metali występujące w postaci różnych nanostruktur (rys. 4.14) cieszą się w ostatnich latach dużym zainteresowaniem ze względu na wyjątkowe właściwości i morfologię. Powszechnymi metodami syntezy takich materiałów są techniki zol-żel oraz techniki hydrotermalne. Natomiast osadzanie nanostruktur MOS jest realizowane na powierzchniach sztywnych przy użyciu technik powlekania za pomocą elementu wirującego, powlekania zanurzeniowego, nanoszenia kropli, sitodruku czy anodowania elektrochemicznego [17].



RYS. 4.14
Przykładowe struktury pionowo zorientowanych nanostruktur ZnO wykorzystywanych do budowy czujników gazu

4.5.2
Nanomateriały węglowe

Od czasu pierwszego doniesienia w 2000 roku o zastosowaniu nanorurek węglowych (*carbon nanotubes*, CNT) jako materiału do wykrywania gazów, ich zastosowanie cieszy się nieustającym zainteresowaniem [20]. Jednym z nanomateriałów węglowych, który wzbudził wielki entuzjazm, jest grafen, jego synteza w 2004 roku zaowocowała zastosowaniem w 2007 roku w czujniku gazowym do detekcji NO_2. Nanokompozyty na bazie węgla oferują doskonałe

właściwości w zastosowaniach związanych z wykrywaniem gazów, m.in. bardzo dobre właściwości termiczne, mechaniczne i elektryczne; dobre właściwości półprzewodnikowe i wysoki stosunek powierzchni do objętości. Z tego powodu nanorurki węglowe i grafen są szeroko stosowane w czujnikach optycznych, akustycznych, konduktometrycznych lub potencjometrycznych. Ponadto, ze względu na biokompatybilność nanomateriałów węglowych, znalazły one zastosowanie jako warstwa przejściowa (tzw. support) w bioczujnikach, wykorzystujących elementy receptorowe biologicznych systemów węchowych. Oba nanomateriały oferują wysoką czułość (poziomy ppb), niskie granice wykrywalności, dobrą stabilność i krótki czas odpowiedzi. Dodatkowo, ze względu na właściwości fizyczne, mogą być stosowane zarówno na sztywnych, jak i elastycznych podłożach. Inne zalety to niski koszt wytworzenia, doskonała kompatybilność z innymi nanomateriałami i zdolność do pracy w temperaturze pokojowej. Aczkolwiek, wdrożenie niemodyfikowanych nanomateriałów węglowych jest obarczone trudnościami związanymi trudną manipulacją, niskim powinowactwem do niektórych grup związków, długim czasem regeneracji, dużą wrażliwością na zmianę temperatury i inne warunki otoczenia. Poprawę wydajności, a także właściwości nanorurek węglowych umożliwia funkcjonalizacja za pomocą odpowiednich procesów chemicznych. Typowe techniki funkcjonalizacji materiałów węglowych to hydroksylacja lub karboksylacja struktury węgla. Funkcjonalizacja CNT może zapewnić nawet 2–3 razy wyższą czułość niż natywne CNT oraz znaczne skrócenie czasu odpowiedzi i powrotu do stanu początkowego czujnika (z 70 do 12 sekund) [21]. Modyfikacja struktury chemicznej

grafenu obejmuje głównie utlenianie. Obecność utlenionych grup funkcyjnych tlenku grafenu lub zredukowanego tlenku grafenu czyni je wysoce hydrofilowymi, co skutkuje ich sukcesywnym wdrażaniem w czujnikach wilgotności [22].

4.5.3
Nanomateriały polimerowe

Polimery to grupa materiałów funkcjonalnych, która cieszy się dużym zainteresowaniem w czujnikach gazu ze względu na niskie koszty produkcji, dobre właściwości mechaniczne, łatwą syntezę, niskie zużycie energii, możliwość miniaturyzacji, szybki czas odpowiedzi i regeneracji. Polimery są szeroko stosowane w chemorezystorach, tranzystorach potencjometrycznych i polowych. Do monitorowania LZO zwykle wybiera się polimery przewodzące samoistnie (*conductive polymers*, CP). Podobnie jak w przypadku MOS, CP działają na zasadzie zmiany przewodnictwa, gdy następuje kontakt z gazem docelowym. Mimo że czułość MOS jest stosunkowo wyższa, polimery przewodzące stanowią ciekawą alternatywę, dzięki znacznie niższemu poborowi mocy. CP są zwykle syntezowane w procesie chemicznego lub elektrochemicznego utleniania odpowiadającego im monomeru, mają w swojej strukturze sprzężone układy π-elektronowe, co czyni je przewodnikami. Najbardziej typowe polimery przewodzące stosowane w czujnikach gazu to: PANI – polianilina, PEDOT – poli(3,4-etyleno-1,4-dioksytiofen), PPy – polipirol, PTs – politiofen, PA – poliacetylen i PPV – polifenylenowinylen. Czujniki gazu na bazie CP odznaczają

się czułością na poziomie kilku ppm i odpowiedzią rzędu kilku minut. Lepsze przewodnictwo można osiągnąć poprzez domieszkowanie lub funkcjonalizację powierzchni organicznej. Nanostruktury 1D- lub 2D-CP znacznie zwiększają wydajność tego typu czujników. Możliwe jest obniżenie granicy oznaczalności (< 50 ppm) i kilkukrotne przyspieszenie czasu odpowiedzi (15–20 s) i regeneracji (50–60 s). Czyste półprzewodniki, takie jak nanoprzewody krzemowe (Si) lub germanowe (Ge) są również stosowane jako materiały czujnikowe w urządzeniach typu FET i konduktometrycznych. Ich popularność wynika z dużej kompatybilności z elektroniką i innymi nanomateriałami. Polimery izolujące (*insulating polymers*, IP), takie jak PDMS (polidimetylosiloksan) są również wykorzystywane w czujnikach gazu. W połączeniu z CP lub innymi wypełniaczami (np. nanostruktury węglowe, tlenki metali) tworzą struktury hybrydowych kompozytów o właściwościach przewodzących stosowanych obecnie w czujnikach amperometrycznych, chemorezystancyjnych, optycznych, akustycznych oraz tranzystorach polowych. Wdrażanie hybrydowych nanokompozytów wiąże się ze znaczną poprawą parametrów pracy czujnika. Dodatkowo, tego typu materiały polimerowe można osadzać na podłożach elastycznych stosowanych w czujnikach umieszczanych np. bezpośrednio na skórze (tzw. *weareable sensors*).

4.5.4
Nanokompozyty biologiczne

Wraz z rozwojem wiedzy na temat mechanizmów warunkujących powonienie w biologicznych układach węchowych [23] można zaobserwować znaczący postęp w dziedzinie bioczujników substancji gazowych. Rozwój technologii bioczujników jest ukierunkowany na zbliżenie się z zakresem czułości do biologicznych odpowiedników, gdzie substancje zapachowe mogą być wykrywane na poziomie nanomoli (lub niżej). Koncepcja, która jest w stanie sprostać tym oczekiwaniom, zakłada wykorzystanie komponentów pochodzenia biologicznego, które pośrednio (syntetyczne peptydy, polimery z nadrukiem molekularnym) lub bezpośrednio (białka, komórki receptorów węchowych) odwzorowują działanie systemów powonienia. Osiągnięcia z zakresu elektroniki, biologii, inżynierii genetycznej, biotechnologii i nanotechnologii dają możliwość konstruowania i wdrażania urządzeń, których rozwój jest ukierunkowany głównie na opracowywanie bioczujników, które odwzorowywałyby sposób działania i charakterystykę powonienia biologicznych układów węchowych. Kluczowym etapem konstrukcji bioczujnika jest etap immobilizacji, inaczej osadzania materiału biologicznego na platformie przetwornikowej wzmacniającej sygnał. Osadzanie wyizolowanych receptorów zapachowych na przetworniku może być realizowane dzięki zamknięciu wybranych elementów receptorów węchowych w nanopęcherzyki (*vesicles*). Charakteryzują się one właściwościami zbliżonymi do komórek węchowych, ale mają znacznie wyższą stabilność i mogą być bezpośrednio unieruchomione na przetworniku drugorzędowym. W tym celu

powszechnie stosuje się biokompatybilne nanostruktury MOS, polimerów czy nanomateriałów węglowych. Nanopęcherzyki są wytwarzane ze sztucznych komórek węchowych z wykorzystaniem cytochalazyny B, ze względu na średnice ok. 100–200 nm mogą być bezpośrednio unieruchomione np. na nanorurkach węglowych (rysunek 4.14 – Czujnik Bio-FET). Ekspozycja nanopęcherzyków na odoranty aktywuje kaskadę sygnałów, czego rezultatem jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów. Tworzą w ten sposób efekt pola na tranzystorze, co prowadzi do zmian jego przewodnictwa. Skuteczna immobilizacja biomolekuł, dobór odpowiedniego przetwornika, optymalizacja metody przetwarzania umożliwiają konstrukcję bioczujników, które pod względem czułości nie ustępują biologicznym odpowiednikom (<10 ppt), co czyni je idealnymi rozwiązaniami np. w analizie oddechu. Jednym z głównych problemów związanych z biomateriałami jest ich niska stabilność i powtarzalność produkcji, wymagają one dobrze zachowanego i izolowanego środowiska, aby zachować funkcjonalność jako warstwa receptorowa bioczujnika [24].

4.5.5
Nanocząstki metali

Czujniki gazu mogą również wykorzystywać inne nanomateriały funkcjonalne, takie jak nanocząstki metali. Wdrażane są głównie jako monowarstwy w czujnikach konduktometrycznych. Do metali, które w formie nanocząstek mogą być nanoszone na podłoża sztywne i elastyczne, należą: Pt, Cd, Cu, Ni, Au, Ag otrzymywane

w rozmiarach od kilku do kilkuset nm średnicy. Ich zastosowanie zwykle prowadzi do znacznej poprawy czułości (poziom ppb). Jedną z głównych zalet nanocząstek metali jest ich wysoka selektywność. Przykładowo nanocząstki Pd są reaktywne w stosunku do H_2, Ag do NH_3, Au do alkenotioli, co czyni je idealnymi kandydatami do wykorzystania w urządzeniach złożonych z matrycy czujników. Niemniej jednak, stosowanie czystych nanocząstek metali jako warstwy aktywnej jest ograniczone głównie ze względu na koszty. Są one powszechnie stosowane jako wypełniacze w kompozytach hybrydowych, znacznie zwiększające wydajność innych materiałów czujnikowych, takich jak tlenki metali, polimery przewodzące czy nanostruktury węglowe.

Rodzaje i kombinacje nanomateriałów stosowanych w czujnikach gazu są tematem badań wielu zespołów badawczych i należą do najnowszych trendów w analizie sensorycznej. Podstawowe parametry metrologiczne, określające użyteczność czujnika w konkretnym zastosowaniu ściśle zależą od charakterystyki warstwy receptorowej. Funkcjonalizacja czujników nanomateriałami umożliwia poprawę określonych parametrów ich pracy i zwiększa możliwości poprawnej identyfikacji i monitorowania substancji gazowych. Urządzenia prototypowe na bazie nanomateriałów są stopniowo wdrażane do pomiarów substancji gazowych, zwłaszcza tam, gdzie jest wymagana wysoka czułość i selektywność. W czujnikach gazu są wykorzystywane w tym celu różne grupy nanomateriałów. Dzięki wysokiemu stosunkowi powierzchni do objętości nanomateriały zapewniają korzystniejszą interakcję z analitami, co skutkuje lepszą wydajnością i optymalnym działaniem. Jeszcze niedawno osiągnięcie czułości poniżej granicy

ppb było niedostępne. Dzięki rozwojowi nanotechnologii i wdrażaniu mikro- i nanostruktur możliwe jest zejście poniżej tej granicy przy jednoczesnym zapewnieniu wysokiej stabilności, wydajności i niskich kosztów eksploatacji. Tego typu urządzenia stanowią realną alternatywę dla konwencjonalnych metod analitycznych i wykazują wysoki potencjał w praktycznych zastosowaniach.

W tabeli 4.5 przedstawiono wady i zalety opisanych powyżej czujników gazowych, których zastosowanie znalazło miejsce w pomiarach emisyjnych, pomiarach w powietrzu wewnętrznym czy na stanowiskach pracy. Ponadto w tabeli 4.5 przedstawiono schematycznie informację, co jest sygnałem wyjściowym danego typu czujnika gazowego w zależności od zmiany stężenia analizowanego gazu w bliskim otoczeniu czujnika.

TABELA 4.5

Zalety, wady oraz generowany sygnał wyjściowy czujników gazowych stosowanych do pomiarów emisyjnych, pomiarów w powietrzu wewnętrznym czy na stanowiskach pracy

Rodzaj czujnika gazowego	**Zalety**	**Wady**	**Sygnał**
Katalityczny	stabilny w temperaturze otoczenia, niski koszt, krótki czas reakcji i regeneracji, wysoka specyficzność dla związków wybuchowych	praca w wysokiej temperaturze, granica wykrywalności na wysokim poziomie, podatny na zatrucia	Zmiana temperatury $\Delta c \rightarrow \Delta T \rightarrow \Delta \sigma \rightarrow \Delta U$
Masowy (QCM, SAW)	wysoka czułość, granica wykrywalności na poziomie ppb, selektywność zależna od warstwy chemoczułej, krótki czas reakcji	niska powtarzalność wykonania, skomplikowany układ pomiarowy, duża wrażliwość na warunki pomiaru, niski stosunek sygnału do szumu	Zmiana masy $\Delta c \rightarrow \Delta m \rightarrow \Delta f$
Optyczny NDIR	wysoka czułość, możliwości wykrywania kilku substancji jednocześnie, niewrażliwość na zmiany otoczenia, odporność na wysokie stężenia	skomplikowana budowa, wysoki koszt, podatność na zabrudzenia lub uszkodzenia optyki	Zmiana prądu wywołana procesem jonizacji cząstek gazu w świetle UV $\Delta c \rightarrow \Delta \mathrm{Op} \rightarrow \Delta I$ lub ΔV
Optyczny PID	granica wykrywalności na poziomie ppb, niewielkie rozmiary, głównie wykrywanie LZO	niska selektywność, jonizacja tylko niektórych lotnych związków chemicznych, krótka żywotność lampy jonizującej	Zmiana prądu $\Delta c \rightarrow \Delta \mathrm{Op} \rightarrow \Delta I \rightarrow \Delta V$
Elektrochemiczny	wysoka czułość, stosunkowo dobre właściwości dynamiczne, stała czasowa jest zwykle krótsza niż 60 sekund, niskie zużycie energii	średnia selektywność, zależność sygnału od temperatury pracy, stosunkowo duże wymiary	Zmiana prądu (czujniki amperometryczne) lub napięcia (potencjometryczne) $\Delta c \rightarrow \Delta I$ lub ΔV
Półprzewodnikowy	wysoka czułość, mały wpływ temperatury na sygnał czujnika, krótki czas odpowiedzi, szybka regeneracja, długa żywotność, małe gabaryty, niska cena	niska selektywność, wysoka temperatura pracy, duże zużycie energii, wrażliwość na związki siarki	Zmiana przewodnictwa (rezystancji) $\Delta c \rightarrow \Delta \sigma \rightarrow \Delta V$

Δc – zmiana stężenia, Δm – zmiana masy, ΔOp – zmiana parametrów optycznych, $\Delta \sigma$ – zmiana przewodnictwa, Δf – zmiana częstotliwości, ΔU – zmiana napięcia, ΔI – zmiana prądu.

4.6
Komercyjnie dostępne gazowe czujniki chemiczne

Rozwój techniczny i technologiczny czujników gazowych zaowocował tym, że na rynku pojawiło się wiele rozwiązań dedykowanych do konkretnych zastosowań. W tabeli 4.6 przedstawiono przykładowe dostępne w handlu gazowe czujniki wraz z ich zakresem pomiarowym. Jest to tylko mały wycinek tego, co obecnie rynek czujników gazowych oferuje potencjalnym użytkownikom. Obserwacje poczynione w ostatnim 10-leciu ewidentnie pokazują, że nowe technologie wytwarzania czujników gazowych są obecnie skupione na ich miniaturyzacji oraz poprawie parametrów metrologicznych, zwłaszcza granicy wykrywalności. Jeszcze nie tak dawno dla czujników gazowych poziom pomiaru analitów śladowych oscylował ok. 1 ppm v/v. Obecnie ta granica została przesunięta w niektórych przypadkach do poziomu 1 ppb v/v. Z całą pewnością kolejne lata przyniosą nowe rozwiązania przeniesione z poziomu badań badawczo-rozwojowych do poziomu zastosowań przemysłowych. Duże nadzieje są oczywiście związane z czujnikami wykorzystującymi nanomateriały.

TABELA 4.6

Przykładowe dostępne w handlu czujniki gazowe z podanym zakresem pomiarowym

Typ czujnika	Producent	Model	Zakres pomiarowy
Katalityczny	Figaro	TGS6812	0–100% DWG H_2
	SGX Sensortech	VQ601/1	0–100% DGW gazów palnych
	City Technology	CMP200	0–100% DGW
	Sixth Sense	CAT25	0–100% DGW
Optyczny NDIR	Alphasense	IRC-A1	0–5%, 0–20%, 0–100% CO_2
	Figaro	CDM7160	300–5000 ppm CO_2
	Wuhan Cubic	CM1106SL	0–2000 ppm CO_2
	DFRobot	Gravity SEN0219	0–5000 ppm CO_2
Optyczny PID	ION Science	MiniPID2	1 ppb–40 ppm, 5ppb–100ppm izobutylenu
	Alphasense	MiniPID	1 ppb–50ppm izobutylenu
	Mocon	piD-TECH	0,5 ppb–2 ppm, 500 ppb–10000 ppm izobutylenu
Elektrochemiczny	Winsen	ME3-H2S	0–100 ppm H_2S
	Figaro	FECS41-250	0–250 ppm NO
	Alphasense	NO2-A1	0–20 ppm NO_2
	SPEC Sensors	3SP-CO-1000-C	0–1000 ppm CO
Półprzewodnikowy	Figaro	TGS2602	1–30 ppm NH_3, etanolu, toluenu
	Figaro	TGS8100	1–100 ppm H_2, CO, etanolu
	SGX Sensortech	MiCS-2714	0,05–10 ppm NO_2, 1–1000 ppm H_2
	Sensirion	SGP30	0–60 ppm VOC

Literatura

1. Szulczyński B., Gębicki J., „Currently commercially available chemical sensors employed for detection of volatile organic compounds in outdoor and indoor air”, *Environments*, 2017, **4**, 21.
2. Yaws C.L., Braker W., *Matheson Gas Data Book*, McGraw-Hill Professional, Nowy Jork 2001, s. 443.
3. Arshak K., Moore E., Lyons G.M., Harris J., Clifford S., „A review of gas sensors employed in electronic nose applications”, *Sensor Rev.*, 2004, **24**, 181–198.
4. Groves W.A., Zellers E.T., „Analysis of solvent vapors in breath and ambient air with a surface acoustic wave sensor array”, *Ann. Occup. Hyg.*, 2001, **45**, 609–623.
5. Popa D., Udrea F., „Towards integrated Mid-Infrared gas sensors”, *Sensors*, 2019, **19**, 2076.
6. *The PID Handbook: theory and applications of direct-reading Photoionization Detectors*, RAE Systems by Honeywell, San Jose 2014, s. 5–28.
7. Sawyer D.T., George R.S., Rhodes R.C., „Polarography of Gases. Quantitative Studies of Oxygen and Sulfur Dioxide”, *Anal. Chem.*, 1959, **31**, 2-5.
8. Dutta D., Landolt D., „Electrochemical Behavior of Nitric Oxide in 4 M H_2SO_4 on Platinum”, *J. Electrochem. Soc.*, 1972, **119**, 1320–1325.
9. Belanger G., „Determination of sulfur dioxide by anodic oxidation on lead dioxide electrodes”, *Anal. Chem.*, 1974, **46**, 1576–1577.
10. Spinelle L., Gerboles M., Kok G., Persijn S., Sauerwald T., „Review of Portable and Low-Cost Sensors for the Ambient Air Monitoring of Benzene and Other Volatile Organic Compounds”, *Sensors*, 2017, **17**, 1520.
11. Moriarty P., „Nanostructured materials”, *Reports Prog. Phys.*, 2001, **64**, 297–381.
12. Kurzydłowski K., Lewandowska M., *Nanomateriały inżynierskie, konstrukcyjne i funkcjonalne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010, s. 1–26.

13. Feynman R., „There's plenty of room at the bottom", *Engineering and Science*, 1960, **23**, 22–36.

14. Ollé E.P., Farré-Lladós J., Casals-Terré, J., „Advancements in microfabricated gas sensors and microanalytical tools for the sensitive and selective detection of odors", *Sensors*, 2020, **20**, 5478.

15. Zdyb A., „Nanostruktury w energetyce", w: *Najnowsze doniesienia z zakresu nanotechnologii*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Gdańsk 2018, s. 7–15.

16. Bănică F.-G., *Chemical Sensors and Biosensors*, Wiley & Sons, Nowy Jork 2012, s. 135–156.

17. Yamazoe N., Shimanoe K., *Semiconductor Gas Sensors*, Woodhead publishing, Sawston 2019, s. 3–34.

18. Sayago I., Aleixandre M., Santos J.P., „Development of Tin oxide-based nanosensors for electronic nose environmental applications", *Biosensors*, 2019, **9**, 21.

19. Szulczyński B., Gębicki J., „Electronic nose - An instrument for odour nuisances monitoring", *E3S Web of Conferences*, 2019, **100**, 00079.

20. Kong J., Franklin N.R., Zhou C., Chapline M.G., Peng S., Cho K., Dai H., „Nanotube molecular wires as chemical sensors", *Science*, 2000, **287**, 622–625.

21. Timsorn K., Wongchoosuk C., „Inkjet printing of room-temperature gas sensors for identification of formalin contamination in squids", *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, 2019, **30**, 4782–4791.

22. Lv C., Hu C., Luo J., Liu S., Qiao Y., Zhang Z., Song J., Shi Y., Cai J., Watanabe A., „Recent advances in graphene-based humidity sensors", *Nanomaterials*, 2019, **9**, 422.

23. Firestein S., „How the olfactory system makes sense of scents", *Nature*, 2001, **413**, 211–218.

24. Wasilewski T., Gębicki J., Kamysz W., „Bioelectronic nose: Current status and perspectives", *Biosens. Bioelectron.*, 2017, **87**, 480–494.

5

Biosensory

Marta JARCZEWSKA

5.1 Terminologia i podstawy działania

Głównym przeznaczeniem opracowanych technik analitycznych jest uzyskanie zautomatyzowanych układów wyróżniających się odpowiednimi parametrami pracy takimi jak: wysoka czułość, niskie granice detekcji oraz selektywność. Wieloletnie badania w tym celu doprowadziły do skonstruowania systemów o podanych właściwościach, które zdefiniowano jako sensory chemiczne. Są to układy, w których informacja chemiczna pochodząca od wybranego składnika badanej próbki jest przekształcana na użyteczny analitycznie sygnał. Sama informacja chemiczna może być generowana w wyniku reakcji chemicznej lub zmian właściwości fizycznych. Do podstawowych elementów sensora zaliczane są:

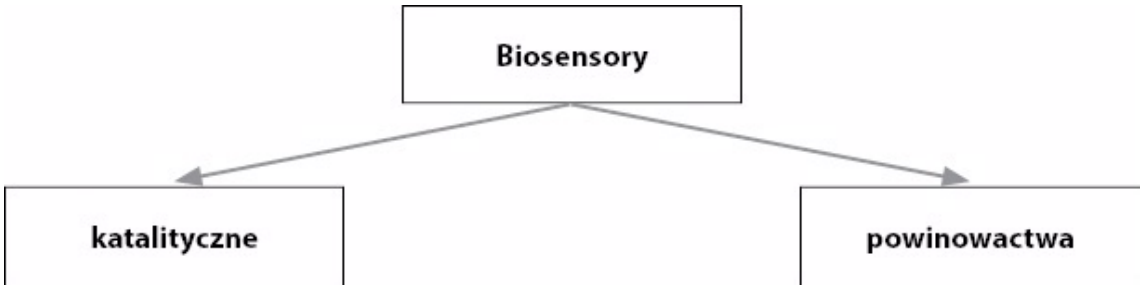
chemiczny układ receptorowy rozpoznający analit oraz przetwornik przekształcający informację chemiczną w mierzalny sygnał.

Biosensor jest szczególnym rodzajem sensora chemicznego, który według definicji IUPAC jest złożony z biologicznie aktywnej warstwy receptorowej oraz określonego elementy przetwornikowego, co ma służyć wykryciu i oznaczeniu substancji chemicznej w badanej próbce [1]. Warstwę receptorową mogą stanowić m.in. enzymy, komórki, fragmenty tkanek, białka oraz kwasy nukleinowe. Efektem oddziaływania między warstwą receptorową i wybranym analitem może być np. wydzielenie ciepła, emisja promieniowania, zmiana masy czy przeniesienie elektronów. W zależności od typu przetwornika wytworzony sygnał ulega przekształceniu do końcowego sygnału analitycznego, np. sygnału prądowego, absorpcji promieniowania czy zmiany temperatury [1].

5.2
Warstwy receptorowe biosensorów (klasy biosensorów)

Biosensory można podzielić ze względu na rodzaj oddziaływania warstwy rozpoznającej z analitem lub ze względu na sposób przetwarzania sygnału. W odniesieniu do mechanizmu oddziaływania warstwy receptorowej można wyróżnić biosensory katalityczne i biosensory powinowactwa [1] (rys. 5.1). Działanie biosensorów katalitycznych polega na udziale warstwy receptorowej w reakcji

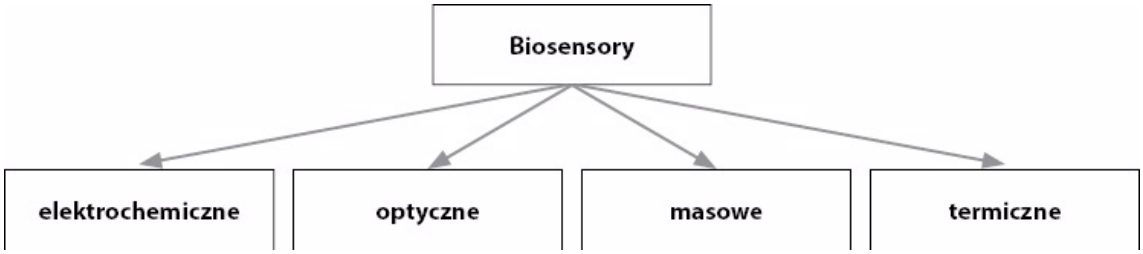
chemicznej, której efektem jest powstanie produktu lub ubytek substratu, który powoduje zmianę sygnału mierzonego w układzie. Wśród cząsteczek, które mogą być wykorzystane w tym przypadku można wymienić: enzymy, komórki bakterii, grzybów, drożdży, organella komórkowe, tkanki, a także kwasy nukleinowe o właściwościach katalitycznych. Z kolei w biosensorach powinowactwa selektywne wiązanie analitu przez warstwę receptorową powoduje powstanie stabilnych kompleksów. Wśród cząsteczek, które znajdują zastosowanie jako elementy receptorowe należy wymienić białka, w tym przeciwciała oraz cząsteczki kwasów nukleinowych.



RYS. 5.1

Podział biosensorów ze względu na rodzaj warstwy receptorowej

Możliwe jest również sklasyfikowanie biosensorów, biorąc pod uwagę rodzaj przetwornika: biosensory elektrochemiczne, optyczne, masowe oraz termiczne (rys. 5.2).



RYS. 5.2

Podział biosensorów ze względu na rodzaj przetwornika

5.3
Immunosensory – istotne narzędzia współczesnej diagnostyki medycznej

Agata KOWALCZYK, Magdalena BAMBUROWICZ-KLIMKOWSKA, Monika NISIEWICZ, Anna M. NOWICKA

W ostatnich latach jesteśmy świadkami ogromnego postępu, jaki dokonał się w diagnostyce medycznej dzięki rozwojowi badań dotyczących nanomateriałów nowych generacji (*next generation nanomaterials*). Szybkie wykrywanie biomarkerów stanów patologicznych ułatwia bowiem skuteczniejszą terapię, monitorowanie oraz zarządzanie chorobami. Jest to szczególnie ważne w personalizowanej medycynie opartej na indywidualizacji diagnostyki medycznej (*point-of-care*, POC) dopasowującej potrzeby pacjenta do odpowiednich strategii terapeutycznych przy jednoczesnym obniżaniu ryzyka wystąpienia działań niepożądanych. Zasadniczą rolę w tego typu diagnostyce odgrywają specyficzne biomarkery, których oznaczenie w płynach ustrojowych ma wartość prognostyczną, pozwalającą na zdefiniowanie ryzyka wystąpienia określonej patologii, a co za tym idzie przewidywania pozytywnych lub negatywnych skutków przyjętego procesu terapeutycznego. Istniejące metodyki oznaczania biomarkerów w płynach ustrojowych i/lub tkankach są zazwyczaj czasochłonne, drogie, generujące fałszywie negatywne wyniki, czasami niewystarczająco czułe,

wymagające często wykwalifikowanego personelu i zaawansowanej aparatury. Dlatego też wciąż potrzebne są szybkie, selektywne i ultraczułe metodyki oznaczania biomarkerów na poziomie submolowym (~10^{-12} mol·l^{-1}) w określonych stanach patologicznych [2], pozwalające jednocześnie na wykrywanie analitu w obecności złożonej matrycy biologicznej [3]. Powyższe wymagania doskonale spełniają immunosensory, które łączą zalety swoistej specyficzności immunoreakcji z bardzo wysoką czułością różnych detektorów chemicznych i biologicznych [4–8].

5.3.1 Budowa i zasada działania immunosensora

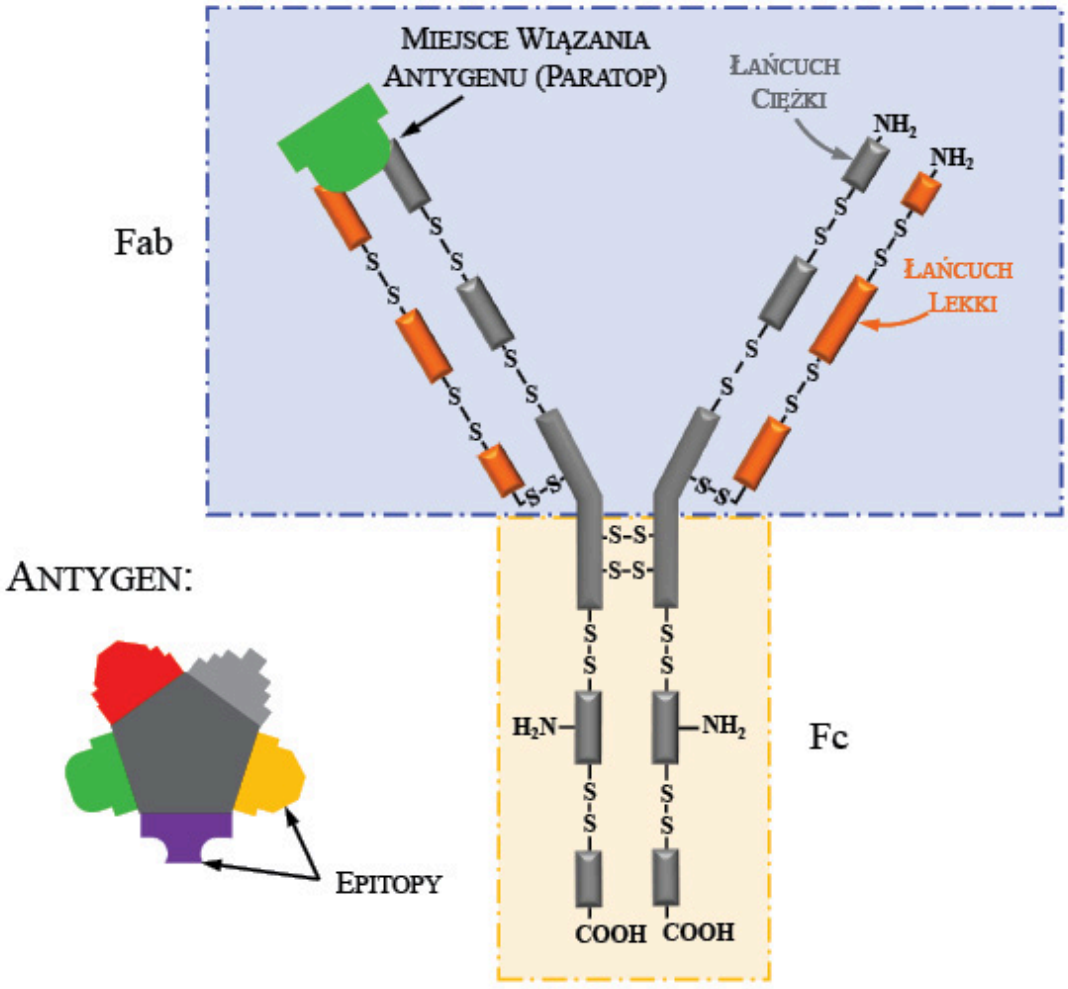
Rozwój biotechnologii i nanotechnologii stał się siłą napędową na drodze postępu związanego z opracowywaniem nowej generacji biosensorów. Tego typu urządzenia łączą w sobie precyzję klasycznych metod analizy chemicznej i bioanalizy z szerokim wachlarzem zaawansowanych rozwiązań konstrukcyjnych. Biosensor, jak każdy sensor, składa się z dwóch podstawowych elementów, tj. bioreceptora i przetwornika. W roli bioreceptora są stosowane mikroorganizmy, enzymy, przeciwciała, czy fragmenty kwasów nukleinowych. Zadaniem bioreceptora jest szybkie i specyficzne rozpoznanie analitu, natomiast podstawową rolą przetwornika jest wizualizacja tego procesu. W przypadku biosensorów, w których rozpoznanie biologiczne opiera się na bardzo specyficznym wiązaniu antygenu (Ag) przez charakterystyczne dla niego przeciwciało (Ab)

mamy do czynienia z immunosensorami [4]. Badania ostatnich lat dowodzą, że immunosensory oparte na przeciwciałach zrewolucjonizowały współczesną diagnostykę medyczną.

5.3.2
Rozpoznanie antygenu przez przeciwciało – podstawą działania immunosensorów

Przeciwciała (immunoglobuliny) to grupa glikoprotein o masie od ok. 150 do ok. 970 kDa, wykazująca wysokie swoiste powinowactwo do antygenów wywołujących ich syntezę [9]. Każdą cząsteczkę przeciwciała tworzą w sumie cztery łańcuchy polipeptydowe, w tym dwa lekkie (L; o masie cząsteczkowej około 23 kDa) i dwa ciężkie (H; o masie cząsteczkowej 50–60 kDa) [10]. Typ łańcucha ciężkiego budującego dane przeciwciało decyduje o jego przynależności do jednej z pięciu klas immunoglobulin definiowanych jako IgA, IgD, IgE, IgG i IgM [11, 12]. Zarówno w łańcuchach lekkich, jak i ciężkich przeciwciał wyróżnia się część stałą (C, ang. *constant*) i zmienną (V, ang. *variable*). Część zmienna jednego łańcucha ciężkiego oraz jednego łańcucha lekkiego tworzy fragment Fab (ang. *Fragment antigen binding*) przeciwciała odpowiedzialny za wiązanie antygenu. W obszarze aminowych zakończeń łańcuchów części zmiennej zlokalizowany jest paratop, czyli rejon odpowiedzialny za rozpoznanie i wiązanie antygenu z przeciwciałem [13]. Paratop jest przestrzennie dopasowany do epitopu, czyli fragmentu antygenu łączącego się bezpośrednio z przeciwciałem. Ponadto, obszar ten

charakteryzuje się dużą różnorodnością aminokwasów i pozwala odróżnić jedno przeciwciało od drugiego. Z kolei część przeciwciała nieuczestnicząca w wiązaniu antygenu tworzy fragment Fc (ang. *Fragment crystallizable*), identyczny dla wszystkich przeciwciał danej klasy, który jest odpowiedzialny za jego właściwości biologiczne. Jeden antygen może mieć wiele epitopów, zatem może być wiązany przez więcej niż jedno przeciwciało. Cząsteczki przeciwciał mają charakterystyczny kształt litery „Y", a ich stabilność zapewniają wewnątrz- i międzyłańcuchowe mostki disiarczkowe (rys. 5.3). Z uwagi na specyficzność oddziaływania przeciwciała z antygenem wyróżnia się dwa typy przeciwciał: monoklonalne i poliklonalne. Przeciwciała monoklonalne (mAb) są wytwarzane z jednego typu komórek B, co gwarantuje im wysoką specyficzność względem jednego epitopu antygenu. Jakakolwiek zmiana chemiczna w budowie antygenu wyklucza jego rozpoznanie przez przeciwciało. Natomiast przeciwciała poliklonalne (pAb) będące mieszaniną przeciwciał, w przeciwieństwie do monoklonalnych, rozpoznają wiele epitopów. Możliwość rozpoznawania wielu epitopów sprawia, że przeciwciała poliklonalne częściej reagują krzyżowo z innymi antygenami o podobnej strukturze [14, 15]. Przeciwciała poliklonalne mogą być wytwarzane w dużych ilościach w krótkim czasie, bez skomplikowanych technologii i przy niskich kosztach, jednak brak im swoistości [16]. Zatem, dla zastosowań takich jak biodetekcja, biooznaczanie, czy opracowywanie nowych strategii terapeutycznych, które wymagają przeciwciał specyficznych dla pojedynczego epitopu, bardziej odpowiednie wydają się być przeciwciała monoklonalne. Oferują one bowiem połączenie wysokiej specyficzności z doskonałą zdolnością powinowactwa.



RYS. 5.3

Schemat budowy przeciwciała

Kompleksy typu przeciwciało-antygen (Ab-Ag) są tworzone na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych, wodorowych, hydrofobowych oraz van der Waalsa, a ich trwałość zależy od powinowactwa przeciwciała względem antygenu, pH, temperatury i mocy jonowej roztworu [17]. Stałe asocjacji większości kompleksów Ab–Ag mieszczą się w zakresie od 10^4 do 10^{12} l/mol [18, 19], natomiast stałe dysocjacji są bardzo małe, rzędu 10^{-6}–10^{-12} l/mol [18]. Duży rozmiar przeciwciał skutkuje wydłużeniem ich

okresu półtrwania w surowicy, co z kolei może być przyczyną dawko-zależnej mielotoksyczności [20], ograniczonej skutecznością w rozpoznawaniu docelowych antygenów [21, 22]. W związku z tym zastosowano inne podejście do implementacji Abs w diagnostyce i celowanej terapii poprzez fragmentację struktury Ab. Proces zmniejszania rozmiarów przeciwciała postępował od otrzymania fragmentów wiążących antygen (Fab; ~ 57 kDa) do jednołańcuchowych fragmentów zmiennych (scFvs; ~ 27 kDa). Po wykazaniu zwiększenia siły działania Abs dzięki zmniejszeniu rozmiaru, technologia fragmentacji trzeciej generacji pozwoliła na uzyskanie zminiaturyzowanego Ab o masie 11–15 kDa [23]. Nanoprzeciwciała (Nbs, ang. *nanobodies*) jako fragmenty jednodomenowych przeciwciał wywodzą się z ciężkich łańcuchów przeciwciał zwierząt wielbłądowatych i ryb chrzęstnoszkieletowych, które odkryto we wczesnych latach 90 XX w. [24]. Podobnie jak kompletne przeciwciało, są one zdolne do selektywnego wiązania się ze specyficznym antygenem. Ze względu na ich niską masę cząsteczkową, wysoką stabilność fizykochemiczną i zdolność do wiązania antygenów niedostępnych dla konwencjonalnych przeciwciał, mają wysoki potencjał wykorzystania ich do konstrukcji biosensorów. Te pojedyncze przeciwciała mogą być umieszczone w dużej ilości, co skutkuje większą gęstością ich upakowania na powierzchniach bioczujników. Oprócz podstawowych zalet w rozpoznawaniu epitopów zlokalizowanych w trudno dostępnych miejscach tkankowo-komórkowych, ich stabilność konformacyjna prowadzi również do większej odporności na warunki regeneracji powierzchni aktywnej sensora.

5.3.3
Sposoby wprowadzania przeciwciała do warstwy receptorowej

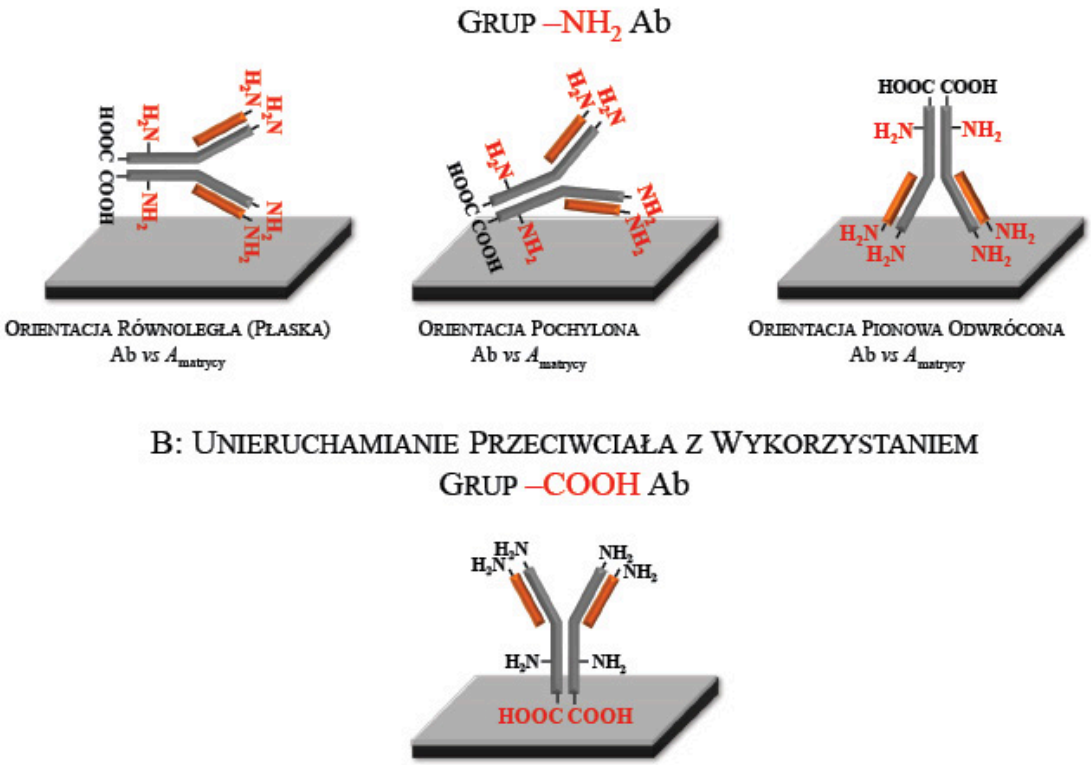
Wybór odpowiedniej metody unieruchamiania bioreceptora na powierzchni wybranej matrycy zależy w dużej mierze od efektu, jaki chcemy osiągnąć. W zależności od charakteru matrycy, stabilności biocząsteczki i jej właściwości stosuje się różne metody unieruchamiania przeciwciał, do których zalicza się zarówno metody fizyczne, jak i chemiczne [25, 26]. Wybierając odpowiednią metodę, należy wziąć pod uwagę takie czynniki, jak: utrzymanie odpowiedniej aktywności bioreceptora, jego odporność na zmiany czynników fizykochemicznych, trwałość oraz preferowaną orientację przestrzenną [26].

Metody fizycznego unieruchamiania przeciwciał opierają się na ich niespecyficznym oddziaływaniu z matrycą, obejmującym różnego typu wiązania niekowalencyjne, tj. jonowe, wodorowe, oddziaływania hydrofobowe, czy siły van der Waalsa. Utworzona w ten sposób warstwa charakteryzuje się niską odpornością na uszkodzenia mechaniczne i dużą przypadkowością przestrzennej orientacji immunoglobulin, co utrudnia określenie frakcji przeciwciał wykazujących aktywność biologiczną wobec określonego typu antygenu. W celu zwiększenia stabilności tego typu układów oraz dostępności paratopu wykorzystuje się pułapkowanie przeciwciał w porowatych matrycach polimerowych. Materiały te są biokompatybilne, dzięki czemu tworzą stabilne środowisko dla prawidłowego funkcjonowania immunoglobulin [27, 28]. Efektywność pułapkowania zależy od wielkości porów, która powinna

być dopasowana do średnicy przeciwciała. Zbyt mała średnica porów uniemożliwia unieruchomienie białka w matrycy polimerowej, natomiast zbyt duża destabilizuje powstały układ. O stabilności utworzonego układu decyduje również ładunek wewnątrz porów, gdyż przeciwstawne ładunki porów i cząsteczek przeciwciała wzmacniają stabilność, natomiast ładunki jednoimienne wywołują efekt odwrotny. Kontrola ładunku porów jest możliwa poprzez monitorowanie pH środowiska lub też poprzez ich modyfikację różnymi grupami funkcyjnymi, np. aminowymi lub karboksylowymi [29].

Aby trwale i w kontrolowany sposób unieruchomić bioreceptor na podłożu, sięga się głównie po ukierunkowane i nieukierunkowane kowalencyjne wiązania. W tym celu odpowiednio modyfikuje się powierzchnię matrycy, stosując warstwy pośredniczące zdolne do chemicznej reakcji z grupami funkcyjnymi przeciwciała. Dodatkowo skład takiej warstwy powinien być tak dobrany, aby nie zaburzał aktywności biologicznej bioreceptora. Najprostszym sposobem trwałego wprowadzenia przeciwciała na powierzchnię matrycy jest sieciowanie, polegające na utworzeniu wiązań kowalencyjnych w trzech wymiarach pomiędzy cząsteczkami immunoglobuliny za pośrednictwem substancji sieciującej, np. aldehydu glutarowego, czy nafionu [30, 31]. Popularność glutaraldehydu wiąże się z jego dużą stabilnością, niską ceną oraz łagodnymi warunkami procesu sieciowania, jak również wysoką wydajnością. Metoda ta ma jednak pewne ograniczenia, gdyż często może prowadzić do utraty aktywności immunoglobuliny oraz dodatkowo problemem jest tu stosunkowo mała powtarzalność wyników.

Kowalencyjne, nieukierunkowane metody wprowadzania przeciwciała do warstwy receptorowej opierają się głównie na wykorzystaniu grup aminowych reszt lizyny występujących w obrębie całej cząsteczki przeciwciała, stanowiących od 4,5 do 6% wszystkich aminokwasów [32]. Mnogość występowania reszt lizyny w cząsteczce przeciwciała prowadzi do wytworzenia kilku wiązań Ab z warstwą pośredniczącą oraz jego wielokierunkowej orientacji: pochylonej lub/i równoległej lub/i pionowej odwróconej [33]. Należy zaznaczyć, że przeciwciała zawierają cztery bardzo reaktywne terminalne grupy aminowe zlokalizowane we fragmencie Fab. Ich obecność prowadzi do unieruchomienia przeciwciała w pozycji nieaktywnej, tzw. pionowej odwróconej. Możliwe sposoby orientacji przeciwciała związanego z matrycą za pośrednictwem grup aminowych ilustruje rys. 5.4A.



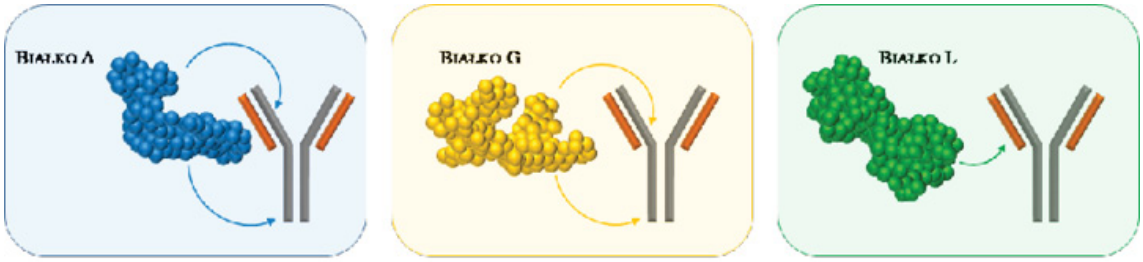
RYS. 5.4

Możliwe orientacje przeciwciała względem matrycy uzyskane przy udziale poszczególnych grup funkcyjnych. Rysunek wykonany na podstawie [34]

Metody ukierunkowanego wiązania kowalencyjnego pozwalają wprowadzić cząsteczki przeciwciała w ściśle określonej orientacji względem podłoża zapewniającej maksymalną wydajność rozpoznania antygenu [33]. W tym celu wykorzystuje się grupy karboksylowe zlokalizowane na końcach łańcuchów polipeptydowych domeny stałej przeciwciała, które prowadzą do prostopadłego ustawienia cząsteczek Ab względem powierzchni (rys. 5.4B). Innym sposobem na ukierunkowane wiązanie przeciwciała jest tworzenie tzw. mostków białkowych pomiędzy przeciwciałem a matrycą za pośrednictwem białka A, G lub L [35, 36]. Białka te są małymi cząsteczkami (30–106 kDa) pochodzenia bakteryjnego: *Staphylococcus aureus* (białko A), *Streptococcus C40* (białko G) i *Peptostreptococcus magnus* (białko L) [37] i wykazują cechy immunoglobulin klasy G ssaków [35, 38]. Białka A i G wiążą się z regionem Fc w łańcuchach ciężkich przeciwciała, podczas gdy białko L wiąże się z łańcuchami lekkimi poza miejscem wiązania antygenu, zgodnie z rys. 5.5.

Ukierunkowane unieruchomienie przeciwciała można również uzyskać, wykorzystując powinowactwo biotyny do awidyny lub streptawidyny [42]. Wówczas cząsteczki przeciwciała sprzęga się z biotyną w obecności aktywatorów: chlorowodorku *N*-(3-dimetyloaminopropylo)-*N*′-etylokarbodiimidu (EDC) i *N*-hydroksysukcynoimidu (NHS), inicjujących reakcję amidacji. Niestety reakcja ta skutkuje losowym biotynylowaniem przeciwciała. Zdecydowanie lepsze rezultaty uzyskuje się, przeprowadzając

reakcje biotynylowania przeciwciała przez wiązanie disiarczkowe za pomocą sukcynoimidylo-4-(*N*-maleimidometylo)cykloheksanu (SMCC) [43]. Kolejną metodą pozwalającą unieruchomić przeciwciało w ściśle określonej orientacji jest metoda oparta na oddziaływaniu z krótkimi fragmentami nukleotydów (*DNA-directed immobilization*; DDI). Metoda DDI do selektywnego wiązania białek znakowanych komplementarnymi oligomerami wykorzystuje wychwytujące oligonukleotydy związane z powierzchnią matrycy [44]. Z uwagi na łagodne warunki prowadzenia procesu mikrostrukturyzacji powierzchni metoda ta umożliwia wytwarzanie macierzy białkowych *in situ*, które wykorzystuje się w multipleksowanych testach immunologicznych [45].



Białko	K_a / M^{-1}	Rozmiar / kDa	Miejsce oddziaływania IgG	pH rozpadu kompleksu IgG białko	Literatura
Białko A	1,4 · 108	42	Fc i Fab	3,5	[39]
Białko G	6,7 · 109	30	Fc i Fab	3,2	[40]
Białko L	5,7 · 107	76 – 106	Fab i *κ*-łańcuchy lekkie Fc	2,0	[41]

RYS. 5.5

Miejsca wiązania białka A, G i L z przeciwciałem IgG. K_a – stała asocjacji

Wykorzystanie unikalnych fragmentów przeciwciał do ich wiązania z matrycą jest dotychczas najbardziej efektywnym sposobem wprowadzania przeciwciała do warstwy receptorowej immunosensora [46]. Takim unikalnym fragmentem są reszty węglowodanowe znajdujące się w domenie przestrzennie oddzielonej od miejsc wiązania antygenu, regionie Fc przeciwciała. Proces unieruchamiania przeciwciała tym sposobem wymaga w pierwszej kolejności utlenienia reszt cukrowych do grup aldehydowych. Obecność grup aldehydowych umożliwia wiązanie z matrycą zawierającą grupy aminowe, tworząc w ten sposób zasadę Schiffa. Ze względu na fakt, że reszty cukrowe obecne są tylko we fragmentach Fc, działanie fragmentów Fab rozpoznających i wiążących antygen jest niczym niezakłócone. W związku z powyższym, tak wprowadzone przeciwciało do warstwy receptorowej charakteryzuje się wysoką specyficzną aktywnością.

5.3.4
Wizualizacja rozpoznania antygenu przez przeciwciało

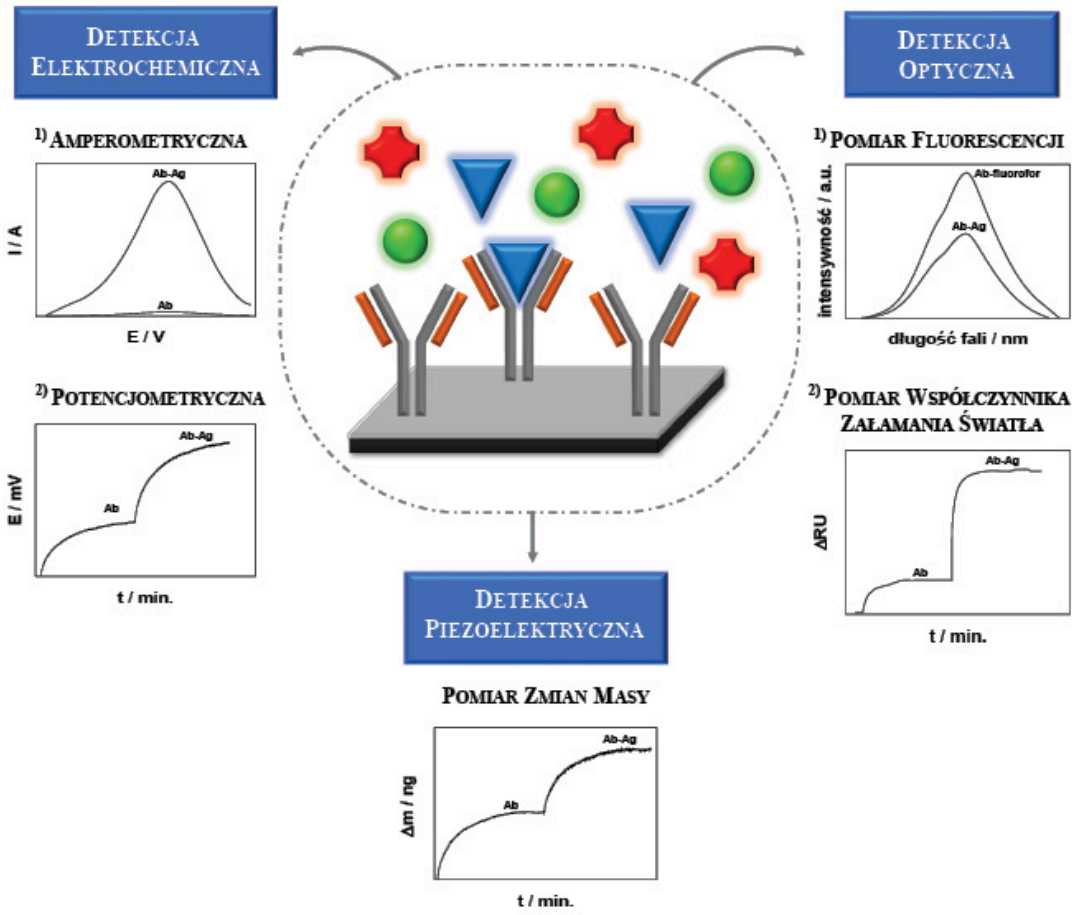
Immunosensory to biosensory oparte na zasadzie interakcji przeciwciało – antygen. W trakcie tego rozpoznania wytwarzany jest sygnał analityczny, który następnie jest przekształcany przez przetwornik w odpowiedź fizykochemiczną. Biorąc pod uwagę typ zastosowanego przetwornika (rys. 5.6), wyróżniamy immunosensory:

- elektrochemiczne (potencjometryczne, amperometryczne i konduktometryczne),
- optyczne (pomiar absorbancji, fluorescencji, reflektancji, luminescencji, współczynnika załamania światła, współczynnika rozproszenia światła itp.),
- piezoelektryczne – detektory masy.

Immunosensory pozwalają oznaczać i wykrywać analit w złożonej matrycy, ponieważ przeciwciała oddziałują tylko z jedną, specyficzną cząsteczką antygenu. Przeciwciała są powszechnie stosowane w rozwoju biosensorów dla dużych cząsteczek. Ich skuteczność w bezpośredniej analizie małych cząstek w niskich stężeniach może być obniżona w następstwie unieruchomienia Ab na stałym podłożu. Techniki immunochemiczne oparte na interakcji przeciwciał z antygenami, takie jak test immunoenzymatyczny (ELISA), nadal zyskują szeroką akceptację w środowiskach analitycznych i regulacyjnych. Techniki te są czułe, selektywne, stosunkowo niedrogie i mają szerokie zastosowanie w jednoczesnej analizie wielu próbek. Do wad testów immunologicznych należy konieczność stosowania odpowiedniego znacznika, jakim może być enzym, fluorofor lub izotop radioaktywny, który jest odpowiedzialny za pośrednie wiązanie antygenu lub haptenu z przeciwciałem i może być przyczyną uzyskania niedostatecznej odpowiedzi w niektórych matrycach. Immunosensory zatem łączą zalety technik testów immunologicznych, w których unieruchamiane przeciwciało jest wykorzystywane do rozpoznawania molekularnego w połączeniu z pewnym trybem bezpośredniej transdukcji sygnału. Są one stosowane głównie w medycynie do wykrywania i monitorowania chorób.

W ostatnich latach tego typu narzędzia analityczne cieszą się niezwykle dużym zainteresowaniem ze względu na ich potencjał do szybkiego, niedrogiego i przenośnego diagnozowania typu POC [47]. Największą popularnością cieszą się immunosensory magnetorezystancyjne [48], mikroimmunosensory elektrochemiczne [49–51], immunosensory z detekcją piezoelektryczną [52] oraz immunosensory wykorzystujące zjawiska fluorescencji i powierzchniowego rezonansu plazmonowego [53]. Przetworniki optyczne są szeroko stosowane w immunochemii klinicznej i środowiskowej ze względu na ich zalety, w tym szybkie generowanie sygnału i szybkie czasy odczytu [54]. Immunosensory optyczne reagują na analit docelowy w postaci możliwego do zidentyfikowania sygnału wyjściowego generowanego przez zmiany właściwości optycznych analitu. Należy zaznaczyć, że spośród tej grupy immunosensory z detekcją SPR wykazują wysoką czułość wykrywania w zakresie stężeń od pM do fM. Nie są one jednak w stanie wykryć analitów w skrajnie rozcieńczonych stężeniach lub o małej masie cząsteczkowej [55, 56]. Z kolei immunosensory magnetorezystencyjne, używane również do ilościowego opisu oddziaływań immunologicznych na powierzchni czujnika, podobnie jak w przypadku fluorescencji wymagają etapu znakowania, tym razem cząstkami magnetycznymi, co znacznie ogranicza ich zastosowanie. Immunosensory piezoelektryczne nie wymagają etapu znakowania, jednak ich ograniczeniem jest konieczność stosowania zaawansowanego oprzyrządowania i wysoko wykwalifikowanego personelu do jego obsługi. W porównaniu ze wspomnianymi powyżej immunosensorami, elektrochemiczne immunosensory

cechują się prostotą działania, niskim kosztem wytwarzania oraz szerokim zakresem pracy.



RYS. 5.6

Możliwe sposoby wizualizacji procesu rozpoznania antygen–przeciwciało

5.3.5
Nanotechnologia – siła napędowa współczesnej analityki medycznej

Obecnie strategia badań nad immunosensorami obejmuje dwa kierunki [57]:

- ulepszanie metod unieruchamiania przeciwciał [58],
- konstruowanie nanostrukturalnych matryc umożliwiających wzmocnienie sygnału detekcji [49, 50].

Szczególnym zainteresowaniem w konstrukcji immunosensorów cieszą się nanomateriały. Zgodnie z definicją Komisji Europejskiej [59] termin nanomateriał oznacza „*naturalny, powstały przypadkowo lub wytworzony materiał zawierający cząstki w stanie swobodnym lub w formie agregatu bądź aglomeratu, w którym co najmniej 50% lub więcej cząstek w liczbowym rozkładzie wielkości cząstek ma jeden lub więcej wymiarów w zakresie 1–100 nm*". Włączenie nanostruktur do konstrukcji biosensora może przynieść nieocenione korzyści właściwe tylko dla nanoskali, mianowicie zdolność do przekazywania informacji na poziomie molekularnym, wzmocnienie niskich poziomów sygnału, przyspieszanie czasu odpowiedzi i możliwość ciągłego monitorowania zmian biomarkera w organizmie. Zalety te wynikają z wysokiego stosunku powierzchni do rozmiarów nanomateriału. Zastosowanie nanotechnologii zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia interakcji molekularnych, które mogą być zaobserwowane jako subtelne zmiany właściwości optycznych, elektrycznych, mechanicznych lub oddziaływań międzyfazowych nanostruktur w odpowiedzi na obecność analitu. Wykorzystanie czujników nanostrukturalnych w biomedycynie niesie

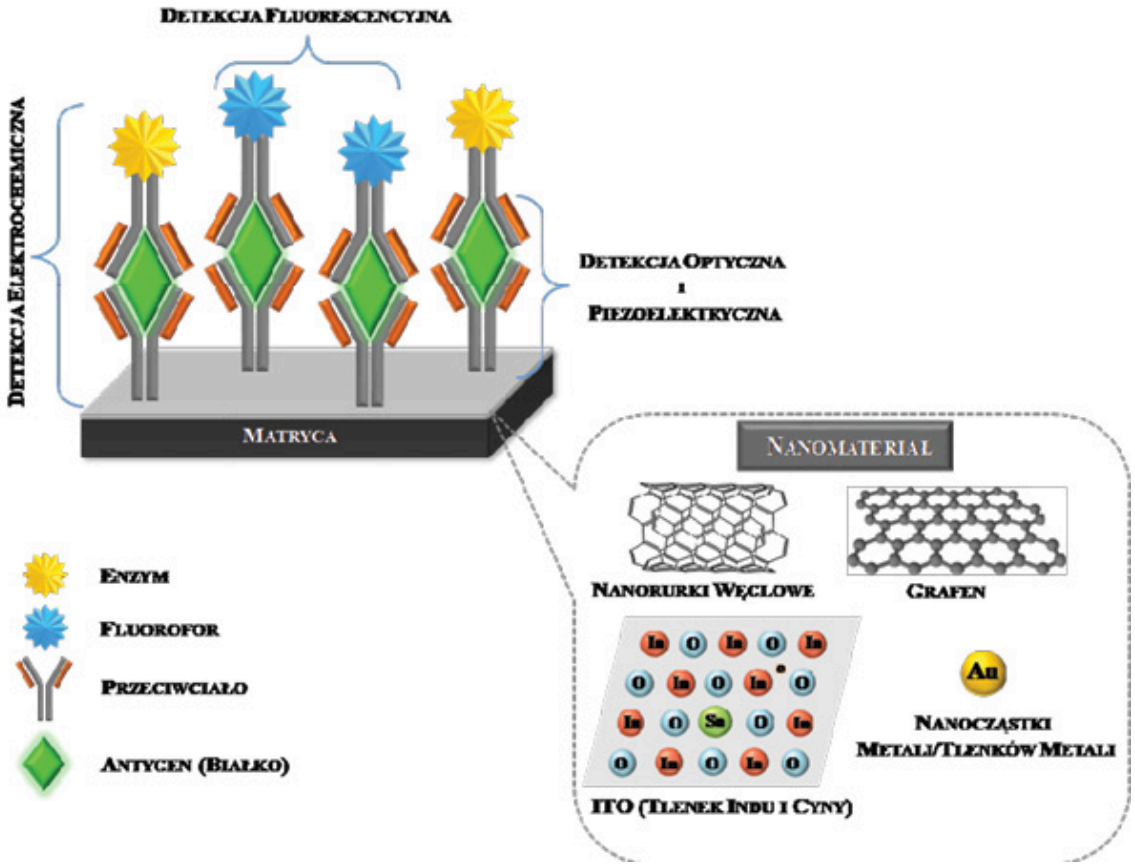
ze sobą ciągłą konieczność niwelowania podziału pomiędzy zaawansowaniem technologicznym związanym z możliwością wykrycia specyficznych związków/struktur a rzeczywistą potrzebą kliniczną. Znaczenie nanosensorów (ich korzyści technologiczne wynikające z nanoskali) w zaawansowanej opiece zdrowotnej, należy rozpatrywać w kontekście potrzeb końcowych użytkowników, czy to w zastosowaniu klinicznym czy przemysłowym.

Sztandarowymi przykładami nanomateriałów, które w ostatnich latach przyczyniły się do rozwoju nanosensoryki, zwiększając czułość i selektywność immunosensorów, były m.in. nanocząstki metali i ich tlenków [60, 61], nanowłókna [62, 63], grafen [64], czy nanorurki węglowe [65, 66]. Niezwykle interesującym przykładem nowego nanomateriału są endoskopowe nanorurki węglowe, które zostały wykorzystane w badaniach funkcji żywych komórek, w tym procesów transdukcyjnych [67]. W wielu przypadkach zastosowanie biosensora *in vivo* jest możliwe tylko wtedy, gdy sensor ma ten sam rozmiar (tj. nm) lub będzie mniejszy niż struktura biologiczna, w obrębie której będzie użyty. Pojedyncze komórki lub nawet organelle mogą być badane bez większych zakłóceń tylko wtedy, jeśli sensor ma stosunkowo małe rozmiary. Należy zwrócić uwagę, że nanomateriały nie tylko zapewniają nanoskalę konstruowanych immunosensorów, ale także mają elektrony i fonony zamknięte w mniej niż trzech wymiarach, co nadaje im unikatowe właściwości fizyczne i chemiczne, które można wykorzystać w diagnostyce i/lub leczeniu chorób.

5.3.6
Przykłady aplikacji immunosensorów w diagnostyce medycznej

Jednym z większych wyzwań współczesnej medycyny jest obecnie skuteczne zwalczanie zagrożeń cywilizacyjnych, w tym chorób nowotworowych, które zajmują drugie miejsce na liście przyczyn umieralności wywołanych chorobami niezakaźnymi. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia każdego roku umiera ok. 75% wszystkich chorych na różnego rodzaju nowotworów. Jednym z powodów odpowiadających za ten stan jest zbyt późne wykrycie choroby nowotworowej. Wczesna diagnostyka zatem nie tylko zwiększa przeżywalność pacjentów, lecz także poprawia rokowania w leczeniu czy zapobiegania występowaniu raka. Przewidywanie ryzyka wystąpienia konkretnej choroby pozwala na wczesne wdrożenie środków zapobiegawczych w celu uniknięcia jej rozwoju. Można tu wykorzystać na przykład sensory zaprojektowane w kierunku badania epigenetycznych zmian komórek, które pozwalają określić ryzyko wystąpienia chorób o podłożu hiper- i hipometylacji. Inne podejście opiera się na wykorzystaniu biomarkerów białkowych, będących specyficznymi cząsteczkami występującymi we krwi lub tkankach, których pomiar lub identyfikacja są skuteczne i niejednokrotnie krytyczne w przewidywaniu, diagnozowaniu i monitorowaniu wielu chorób, w tym chorób nowotworowych. W przypadku nowotworów, wczesne wykrycie wymaga zastosowania sensorów o ultrawysokiej czułości, mających zdolność wykrywania markerów nowotworowych na poziomie stężenia poniżej pg/mL. Ponadto, dąży się do zwiększenia

wartości predykcyjnej testów przesiewowych poprzez jednoczesne oznaczanie stężeń wielu markerów nowotworowych. Wymaga to zastosowania ekstremalnie czułych biosensorów zdolnych do wykrywania analitu w obecności złożonej matrycy biologicznej. Niestety, granice wykrywalności obecnie stosowanych metod analitycznych do wykrywania biomarkerów białkowych (np. test immunoenzymatyczny ELISA) są dalece niezadawalające z punktu widzenia ich użyteczności klinicznej. Najnowsze badania wskazują, że platformy immunologiczne konstruowane z wykorzystaniem nanomateriałów, na powierzchni których są unieruchomione specyficzne przeciwciała w celu selektywnego wychwytywania analitu/biomarkera (rys. 5.7), charakteryzują się doskonałą czułością. Zatem mogą być one stosowane jako narzędzie do rozróżniania różnych stadiów rozwoju nowotworów, w tym jako wskaźniki rokowania rozwoju nowotworzenia czy przebiegu zastosowanej terapii.



RYS. 5.7

Schemat platformy immunologicznej

TABELA 5.3.1

Porównanie komercyjnych testów immunochemicznych [69, 70]

Nazwa testu	Producent	Choroba	Biomarker	Czułość	Specyficzność	Czas analizy
PSA Semi-Quantitative Rapid Test	CTK Biotech	rak prostaty	PSA	4 ng·mL–1	91%	15 min
AFP Test	Innovation Biotech	rak wątroby	AFP	25 ng·mL–1	99%	10 min
CEA Serum Rapid Test	Cortez Diagnostics Inc.	rak piersi, rak płuca	CEA	5 ng·mL–1	100%	10 min
OncoE6 Cervical test	Arbor Vita Corp	rak szyjki macicy	E6 onkoproteina	84,6%	98,5%	150 min
CA125 Rapid Screen Test Kit	Quicking Biotech Co., Ltd	rak płuca	CA 125 (MUC16)	95 IU·mL–1	80%	5–10 min
Alere NMP22 BladderCheck	Alere	rak pęcherza	NMP22	99%	99%	30 min
Alere Determine HIV-1/2 Ag/Ab combo	Alere	AIDS	HIV-1/2 Ab	–	99,75%	50 min
Rapid Response CKMB Test	BTNX Inc.	zawał mięśnia sercowego	CKMB	5 ng·mL–1	99,8%	10 min
Meritas® Troponin I	Trinity Biotech	zawał mięśnia sercowego	Troponina I	0,036 ng·mL–1	–	10 min
StatusFirst CHF NT-proBNP	LifeSign	zastoinowa niewydolność serca	NT-proBNP	20 pg·mL–1	–	15 min

Do najczęściej stosowanych biomarkerów białkowych zaliczamy: antygen nowotworowy 125 (CA125), antygen specyficzny dla prostaty (PSA), alfa-fetoproteinę (AFP), białko receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2), estrogen (ER) i progesteron (PR), antygen nowotworowy 15-3 (CA15-3), BRCA1 i BRCA2, białko p53, antygen karcynoembrionalny (CEA), odwrotną transkryptazę ludzkiej telomerazy (hTERT), CYFRA21-1, białko C-

reaktywne (CRP), czy lipoproteinę a (Lp(a)) [67]. Tabela 5. 1 zawiera porównanie przykładowych komercyjnych testów immunochemicznych stosowanych w diagnostyce medycznej.

5.3.7
Perspektywy i ograniczenia

Dzisiejsze systemy opieki zdrowotnej rozwijają tanie, szybkie, nieinwazyjne i przyjazne dla pacjenta narzędzia, które mogą dostarczyć wiele danych na podstawie analizy pojedynczej próbki. Kontrolowane i monitorowane zdalnie poszerzają zakres podejmowania decyzji w odpowiednim czasie. Ponadto wykorzystanie technologii informacyjnych i komunikacyjnych w opiece zdrowotnej (e-zdrowie) w celu poprawy diagnostyki, leczenia, monitorowania i zarządzania stymuluje również badania i rozwój urządzeń przenośnych do monitorowania stanu zdrowia pacjentów. W tej strategii immunosensory, a w szczególności nanoimmunosensory wyraźnie zyskują coraz większe znaczenie w analizie klinicznej opartej na diagnostyce zdefiniowanych biomarkerów określonych jednostek chorobowych. Należy jednak pamiętać, że specyficzność, wrażliwość i zdolność do wykrywania analitu na bardzo niskim poziomie (rzędu 10^{-18}–10^{-9} mol/L) w przypadku immunosensorów jest zarówno ich zaletą, jak i wadą, szczególnie w odniesieniu do próbek rzeczywistych charakteryzujących się szerokim spektrum substancji, potencjalnie zaburzających ich pracę. Wiadomo, że środowisko ma ogromny wpływ na powinowactwo antygenu do przeciwciała, co może

skutkować wynikiem fałszywie dodatnim. Dlatego szczególną uwagę przywiązuje się do optymalizacji pracy immunosensorów w danych warunkach i standaryzacji otrzymanych wyników. Jednak pomimo ogromnego postępu technologicznego wysoka czułość i dokładność analizy oraz odpowiednia żywotność i miniaturyzacja są wciąż dużym wyzwaniem w konstrukcji immunosensorów.

Ponadto, powszechne stosowanie immunosensorów w diagnostyce POC narzuca warunek automatyzacji i miniaturyzacji systemu. Skomplikowany proces konstrukcji immunosensorów i ich późniejsza kalibracja, aż do produkcji masowej, sprawiają, że obecnie produkcja tego typu urządzeń jest jeszcze zbyt trudna i kosztowna. Inne wyzwania kluczowe dla perspektyw komercjalizacji obejmują zapewnienie stabilności przechowywania przygotowanych bioplatform i biokoniugatów nanomateriałów oraz zapewnienia warunków transportu z zachowaniem ich odpowiedniej funkcjonalności. Dużym wyzwaniem jest także możliwość jednoczesnego wykrywania wielu biomarkerów oraz kontrola, a wręcz eliminacja niepożądanego procesu nieswoistej adsorpcji analitu, jak również interferentów obecnych w próbkach biologicznych. Nie ma żadnych wątpliwości, że opracowanie i wdrożenie tego rodzaju systemów w diagnostyce POC przyśpieszy podejmowanie decyzji klinicznych, a co za tym idzie zmniejszy stres pacjenta i koszty opieki zdrowotnej. Niewątpliwie, dzięki ciągłemu rozwojowi biologii molekularnej jak i nanotechnologii nanosensory immunochemiczne będą mogły z powodzeniem zastąpić procedury stosowane obecnie w rutynowych oznaczeniach biomarkerów.

Chociaż dogłębna analiza doniesień literaturowych pokazuje, że istnieje duża liczba immunosensorów skonstruowanych na bazie

biomolekuł zdolnych do spełnienia wymaganej czułości i selektywności dla zastosowań praktycznych, większość z nich nadal pozostaje w fazie koncepcyjnej lub na prototypowych etapach rozwoju i tylko ich ograniczona liczba wykazała przydatność w analizie rzeczywistych próbek pobranych od pacjenta w sposób nieinwazyjny lub mało inwazyjny (głównie surowica, mocz i ślina). Warto jednak wspomnieć, że liczba rzeczywistych próbek pacjentów wykorzystywanych w tych metodach nigdy nie jest wystarczająca, aby zapewnić wiarygodną walidację immunosensora i że obecnie tylko bardzo ograniczona liczba biomarkerów znalazła zastosowanie kliniczne. Obowiązkowa walidacja tych urządzeń do oznaczania różnego typu biomarkerów przy użyciu dużej liczby próbek pacjentów musi być przeprowadzana nie tylko pod względem czułości, selektywności i dokładności, ale także szybkości, prostoty obsługi i kosztów w odniesieniu do innych dostępnych metod analitycznych stosowanych w diagnostyce medycznej. Niestety, pomimo ogromnych postępów poczynionych w ostatnich latach i bardzo obiecujących możliwości wykazanych w już przeprowadzonych oznaczeniach biomarkerów przy użyciu immunosensorów, ich komercjalizacja wciąż jest bardzo dużym wyzwaniem. Związane jest to przede wszystkim z trudnościami w osiągnięciu powtarzalnych wyników ilościowych, które zależą zarówno od wytworzenia identycznych partii czujników, jak i od kontroli zmiennych zewnętrznych, które mogą znacząco wpłynąć na ich wydajność.

5.4
Biosensory DNA i aptasensory

Marta JARCZEWSKA, Robert ZIÓŁKOWSKI

W wyniku rozpoczętego w 1990 roku projektu sekwencjonowania ludzkiego genomu (*Human Genome Project*) okazało się, że geny stanowią jedynie około 5% całej sekwencji ludzkiego DNA. Pozostała część jest związana m.in. z regulacją szeregu procesów w organizmie. Dotyczy to inicjacji oraz regulacji procesu transkrypcji (wiązanie się z określonymi białkami czy komplementarnymi kopiami genów), przeprowadzania w sposób pośredni szeregu reakcji chemicznych poprzez stanowienie matrycy dla katalitycznych fragmentów DNA/RNA tzw. rybozymów, czy chociażby wpływanie na powstawanie mutacji punktowych i zmianę ilości DNA w komórce poprzez występowanie transpozonów i retrotranspozonów [71]. Jak się zatem okazuje, poza kodowaniem przez kwasy nukleinowe kopii podstaw życia, wykazują one wiele ciekawych właściwości, w tym funkcje katalityczne czy powinowactwa do odpowiednich ligandów w tym np. białek. Możliwe jest zatem uzyskanie przez warstwę receptorową biosensora (do tworzenia której wykorzystano fragmenty DNA lub RNA) funkcji odpowiadającej praktycznie każdej cząsteczce biologicznej jak enzym, przeciwciało, receptor itp. Ta różnorodność form oraz możliwości zastosowania kwasów nukleinowych w warstwach receptorowych pozwala wyróżnić dwa typy biosensorów tworzonych z ich udziałem:

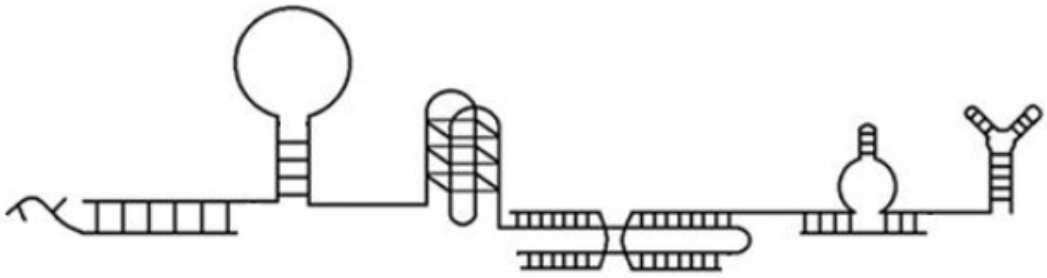
- biosensory powinowactwa – w warstwie receptorowej są unieruchamiane typowe sekwencje DNA/RNA oraz sekwencje

kwasów nukleinowych należących do grupy aptamerów i ryboprzełączników;

- biosensory katalityczne – jak element bioczuły stosowane są tzw. DNAzymy.

Biosensory powinowactwa, w szczególności dedykowane wykrywaniu określonej sekwencji DNA, znajdują zastosowanie wszędzie tam, gdzie niezbędna jest analiza sekwencji genów. Jest to np. rozpoznawanie chorób, za które są odpowiedzialne geny, w tym badania prenatalne czy też wstępna diagnostyka pacjentów, wykrywanie infekcji bakteryjnych lub wirusowych, badania organizmów oraz żywności genetycznie modyfikowanej [72]. Podstawą opracowania biosensorów zawierających w warstwie receptorowej aptamery/ryboprzełączniki czy też DNAzymy były wspomniane już właściwości enzymatyczne i receptorowe niektórych naturalnie występujących cząsteczek RNA [73].

Do jednych z najistotniejszych typów tzw. funkcjonalnych kwasów nukleinowych (*functional nucleic acids*) należą aptamery, które są krótkimi, liczącymi do 80 nukleotydów jednoniciowymi sekwencjami DNA lub RNA [74]. Cząsteczki te w wyniku oddziaływania z określonym analitem zmieniają swoją konformację, czemu towarzyszy uformowanie lub rozwinięcie charakterystycznych struktur trzeciorzędowych, takich jak pseudowęzły, „spinki" oraz G-kwadrupleksu (rys. 5.8) [75]. Powstanie kompleksu aptamer–analit jest możliwe na skutek występowania oddziaływań elektrostatycznych, wiązań wodorowych, oddziaływań van der Waalsa, oddziaływań między pierścieniami aromatycznymi, czy dopasowania przestrzennego [76].



RYS. 5.8
Przykłady struktur funkcjonalnych kwasów nukleinowych

Należy podkreślić, że aptamery określane są często mianem „sztucznych przeciwciał” z uwagi na wykazywanie przez nie powinowactwo do wybranego analitu o sile porównywalnej do przeciwciał. Jednak podstawową różnicą jest możliwość ich uzyskiwania na drodze syntezy chemicznej z wysoką wydajnością i powtarzalnością. Co więcej, możliwe jest wprowadzenie modyfikacji do sekwencji aptamerowej, co ma służyć poprawie stabilności, a także pozwala na dowiązanie grup funkcyjnych służących ich immobilizacji na powierzchni stałej bądź cząsteczek znaczników, które stanowią źródło sygnału, np. prądowego lub fluorescencyjnego [76]. Istnieją doniesienia literaturowe, w których wykazano nawet większe powinowactwo aptamerów do konkretnego analitu w porównaniu do przeciwciał, co z drugiej strony może być niekorzystne ze względu na brak odwracalności wiązania aptameru z daną cząsteczką [77]. Rozwiązaniem tego ograniczenia jest możliwość zmiany warunków eksperymentalnych podczas procesu identyfikacji sekwencji aptamerowych, czego efektem jest uzyskanie zbioru cząsteczek aptamerów o innych właściwościach.

5.4.1
Proces SELEX

Sekwencje aptamerowe wykazują wysokie powinowactwo do określonego analitu i są identyfikowane za pomocą techniki SELEX. Technika ta została zastosowana po raz pierwszy w 1990 r. przez dwa niezależne grupy badawcze. Grupa Tuerka i Golda skupiała się na badaniu oddziaływania pomiędzy polimerazą T4 DNA (gp43) i miejscem wiązania rybosomu w miRNA, która była odpowiedzialna za kodowanie enzymu. W tym samym czasie podobną procedurę zastosowała grupa Ellingtona i Szostka, która dokonała izolacji RNA, które tworzyło trójwymiarową strukturę w wyniku oddziaływania z barwnikami organicznymi, takimi jak Cibacron Blue i Reactive Blue 4 [76, 77]. Proces SELEX został użyty do identyfikacji sekwencji, które wykazują wysokie powinowactwo do analitów różnej klasy, począwszy od jonów metali, a skończywszy na białkach i komórkach bakterii. Aptamery, które zostały zidentyfikowane za pomocą procesu SELEX, wykazują powinowactwo na poziomie piko i nanomolowym. Ich główną zaletą w porównaniu do przeciwciał jest możliwość ich chemicznej syntezy z wysoką wydajnością oraz zdolność do wprowadzenia licznych modyfikacji do ich struktury, które mają na celu poprawę stabilności oraz możliwość immobilizacji na powierzchniach stałych. Proces SELEX składa się z powtarzających się cykli, które umożliwiają identyfikację zbioru sekwencji RNA lub DNA, wykazujących największe powinowactwo do określonego analitu (rys. 5.9). Pierwszy etap polega na utworzeniu biblioteki sekwencji RNA lub DNA, które są uzyskiwane za pomocą techniki kombinatoryjnej, umożliwiającej uzyskanie nawet 10^{15}

różnych sekwencji [78]. Sekwencja aptamerowa składa się z rejonu zmiennego o długości 20–80 nukleotydów oraz otaczających stałych fragmentów o długości 18–21 nukleotydów, które umożliwiają przeprowadzenie reakcji PCR. W przypadku sekwencji RNA jest konieczne przepisanie biblioteki DNA na RNA. Biblioteka z sekwencjami RNA lub DNA jest inkubowana z wybranym analitem i są tworzone kompleksy analit–aptamer. Następnie niezwiązane sekwencje aptamerowe są oddzielone od kompleksów i w tym celu jest stosowana filtracja z wykluczeniem z użyciem nitrocelulozy, chromatografia powinowactwa, a także chromatografia kapilarna oraz cytometria przepływowa lub są stosowane cząstki magnetyczne. Kolejnym krokiem jest rozdzielenie kompleksów i dochodzi do wymywania aptamerów dzięki zmianie siły jonowej roztworów, temperatury lub przez zastosowanie czynniki chaotropowych. Następnie aptamery są powielane z użyciem techniki PCR i RT PCR. W przypadku RNA w każdym cyklu dochodzi do odwrotnej transkrypcji i amplifikacji z użyciem techniki RT PCR. W ten sposób powstaje zmniejszony zbiór sekwencji, który jest wykorzystywany w kolejnym cyklu selekcji. Zazwyczaj przeprowadza się od 8 do 15 cykli, a ostatecznie powstały zbiór sekwencji jest klonowany i sekwencjonowany [76, 78]. W celu poznania struktury trójwymiarowej sekwencji aptamerowych są stosowane techniki NMR i krystalografia. Należy podkreślić, że od pierwszego zastosowania metody SELEX zostały opracowane zmodyfikowane metody, które miały na celu poprawę efektywności identyfikacji sekwencji. Proces SELEX może być stosowany do wykrywania sekwencji wykazujących powinowactwo do analitów różnej klasy: jonów metali, małych barwników organicznych, białek i komórek.

Należy podkreślić, że w odróżnieniu od przeciwciał aptamery mogą być regenerowane przy użyciu odpowiednich warunków. Co więcej, możliwe jest wprowadzenie modyfikacji, które mają ograniczyć podatność sekwencji na działanie nukleaz w postaci m.in. substytucji grupy hydroksylowej w pozycji 2′ w pierścieniu rybozy grupą aminową, atomem fluoru czy grupą metoksylową [76, 78]. W trakcie selekcji jest możliwe dobranie warunków w tym wartości pH, siły jonowej i temperatury. Zastosowanie procesu SELEX ma też swoje ograniczenia, gdyż nie jest możliwe uzyskanie sekwencji dla każdego rodzaju analitu. Nie istnieje standardowy protokół procesu SELEX, dlatego jest niezbędne dopasowanie warunków do każdego przypadku. Tylko niektóre z etapów procesu SELEX mogą być automatyzowane. Co ważne, tylko kilka sekwencji aptamerowych znalazło swoje zastosowanie, np. jako warstwy receptorowe, które są specyficzne na m.in. trombinę, białka VEGF czy PSA. Głównym powodem jest złożona procedura procesu SELEX, jej wysoki koszt oraz ograniczona stabilność uzyskanych sekwencji aptamerowych.

RYS. 5.9
Schematyczne przedstawienie przebiegu procesu SELEX

5.4.2
Zastosowanie aptamerów i kwasów nukleinowych

Dzięki opisanej technice na przestrzeni lat zidentyfikowano ogromną liczbę „sztucznych" sekwencji funkcjonalnych kwasów nukleinowych [79, 80]. Natomiast obszar potencjalnego ich zastosowania obejmuje m.in. lecznictwo [81] (przykładem jest lek Macugen stosowany do leczenia zwyrodnienia plamki żółtej ocznej czy leki zawierające aptamery specyficzne na trombinę oraz czynnik IX), w tym dostarczanie leków do określonych tkanek w organizmie [82], poszukiwanie leków [83], metody rozdzielania [84] (wysokosprawna chromatografia cieczowa, elektroforeza kapilarna), badania materiałowe [85], nanotechnologię [86] oraz oczywiście biosensory [74, 87]. W ostatnim przypadku mimo doniesień na temat zastosowania ich do detekcji organizmów patogennych, takich jak *Escherichia coli* czy *Salmonella typhimurium*, a także linii komórkowych m.in. MCF-7, HL-60, K562, są one najczęściej stosowane jako warstwy receptorowe do wykrycia mniejszych cząsteczek, w tym jonów metali, prostych związków organicznych oraz białek [88]. Biorąc pod uwagę powyższe, można zatem uznać, że zakres analitów, jakie można oznaczać dzięki biosensorom zawierającym w warstwie receptorowej kwasy nukleinowe, jest praktycznie nieograniczony.

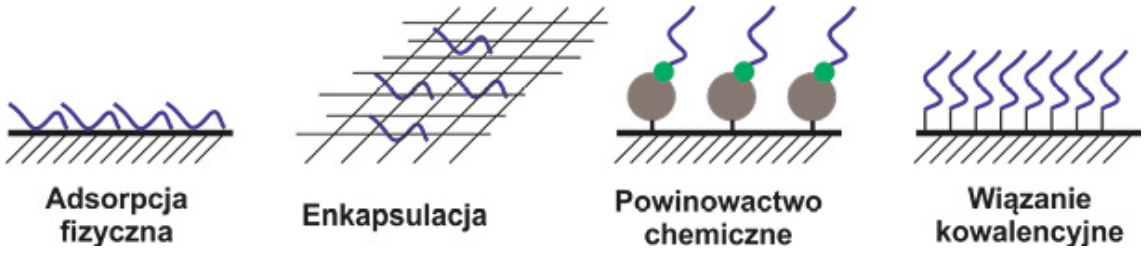
Z kolei sama chemiczna budowa kwasu deoksyrybonukleinowego jako biopolimeru, w którym funkcję monomerów pełnią deoksyrybonukleotydy, wykazuje szereg interesujących i przydatnych z analitycznego i praktycznego punktu widzenia właściwości. Można do nich zaliczyć przede wszystkim dostępność różnorodnych heteroatomów, np. atomów fosforu, azotu czy tlenu. Umożliwiają one łatwą modyfikację DNA wybranymi grupami funkcyjnymi czy też stanowią miejsca bardzo selektywnego wychwytu określonych jonów z próbki. Swobodne manipulowanie budową chemiczną kwasów nukleinowych, bez większego wpływu na ich funkcje biologiczne, zwiększa ich odporność na działanie enzymów restrykcyjnych czy też dopasowanie tego polimeru do konkretnego zastosowania. Z kolei możliwość produkcji DNA za pomocą syntezy w laboratorium sprawia, że jest on tani, charakteryzuje się wysoką czystością, niską ceną jednostkową czy brakiem problemów bioetycznych wynikających z konieczności wykorzystywania zwierząt w procesie produkcji (w przeciwieństwie do przeciwciał).

5.4.3
Metody immobilizacji kwasów nukleinowych

Pośrednim wynikiem prac nad biosensorami i mikromacierzami DNA czy RNA było opracowanie metod unieruchamiania kwasów nukleinowych na różnego typu podłożach stałych [79]. Dzięki pierwszym urządzeniom tego typu możliwe było wykrywanie z bardzo dużą selektywnością, przy zachowaniu niskiej granicy

detekcji i niewielkiej konsumpcji odczynników sekwencji DNA specyficznych dla konkretnych mikroorganizmów, markerów nowotworowych czy też rozróżnianie nawet pojedynczych mutacji. Wprowadzenie do warstw receptorowych biosensorów funkcjonalnych kwasów nukleinowych, w tym sond przyjmujących określone struktury przestrzenne, np. szpilki do włosów (*molecular beacon*), aptamerów DNA/RNA, rybozymów czy deoksyrybozymów w pewnym sensie je zrewolucjonizowało. Dzięki szerokiej gamie możliwych do identyfikacji analitów (zaczynając od prostych jonów, a kończąc na całych komórkach), katalizowaniu reakcji (trawienie RNA lub DNA, ligacja RNA lub DNA, fosforylacja DNA), prostocie syntezy oraz wprowadzaniu pożądanych modyfikacji, możliwej do uzyskania dużej odporności na działanie enzymów restrykcyjnych, odzyskiwaniu właściwości po procesie denaturacji i renaturacji (w tym możliwość prowadzenia oznaczenia w nietypowych dla enzymów czy przeciwciał wartościach pH oraz temperatury) oraz niewielkiej cenie, urządzenia takie są bardzo ciekawą alternatywą dla wielu obecnie stosowanych czujników i technik analitycznych. Należy jednak pamiętać, że aby w pełni móc wykorzystać możliwości, jakie oferują biosensory, w których warstwę receptorową stanowią kwasy nukleinowe (np. metody analiz wieloanalitowych, określanie profili metabolicznych), niezbędne jest ich unieruchomienie na odpowiednim podłożu lub wewnątrz stosownego materiału. Chodzi tutaj nie tyle o trwałe połączenie tych dwóch elementów, co o zachowanie odpowiedniej swobody, np. dla funkcjonalnych kwasów nukleinowych, które potrzebują odpowiednio dużo miejsca, aby móc przybrać stosowną strukturę przestrzenną po związaniu analitu. Do najpopularniejszych metod należą: adsorpcja fizyczna,

pułapkowanie w matrycy, wiązanie przez powinowactwo oraz wiązanie kowalencyjne [89] (rys. 5.10).



RYS. 5.10
Najpopularniejsze sposoby immobilizacji kwasów nukleinowych na podłożach stałych

Adsorpcja

Adsorpcja jest najprostszym sposobem unieruchamiania kwasów nukleinowych. Ze względu na budowę DNA/RNA oraz zastosowane powierzchnie, unieruchamianie jest wynikiem sumy oddziaływań między nimi: elektrostatycznych (jon–jon), hydrofobowych, Van der Waalsa (dipol–dipol), wiązań wodorowych [79]. Jako że detekcja z wykorzystaniem zarówno genosensorów, jak i biosensorów z unieruchomionymi funkcjonalnymi kwasami nukleinowymi wymaga zmiany w ich strukturze przestrzennej, adsorpcja nie jest „pożądaną" techniką przygotowywania warstw receptorowych [90]. Nici kwasów nukleinowych, oddziałując z powierzchnią, mogą bowiem łączyć się z nią wielopunktowo, co znacznie ogranicza możliwość zmian w ich strukturze przestrzennej. Ponadto, adsorpcja jest wyłącznie osiągnięciem określonego stanu równowagi między stężeniem oligonukleotydów znajdujących się na powierzchni przetwornika

a sondami pozostającymi w roztworze, dlatego nawet niewielkie zmiany pH, siły jonowej czy też wymiana roztworu, z którego następowała adsorpcja, niejednokrotnie prowadzą do desorpcji z powierzchni elektrody tak przygotowanej warstwy receptorowej [91]. Zjawisko to utrudnia prowadzenie wszelkich analiz ilościowych. Adsorpcja z wykorzystaniem oddziaływań elektrostatycznych, w których anionowe grupy fosforanowe oligonukleotydów będą oddziaływały z np. kationowymi grupami aminowymi wprowadzonymi na powierzchni przetwornika, doprowadzi do sytuacji, w której wszelkie cząstki anionowe z roztworu będą niespecyficznie oddziaływać z taką powierzchnią. Zjawisko to w dramatyczny sposób może wpłynąć na selektywność takiego biosensora [79].

Enkapsulacja

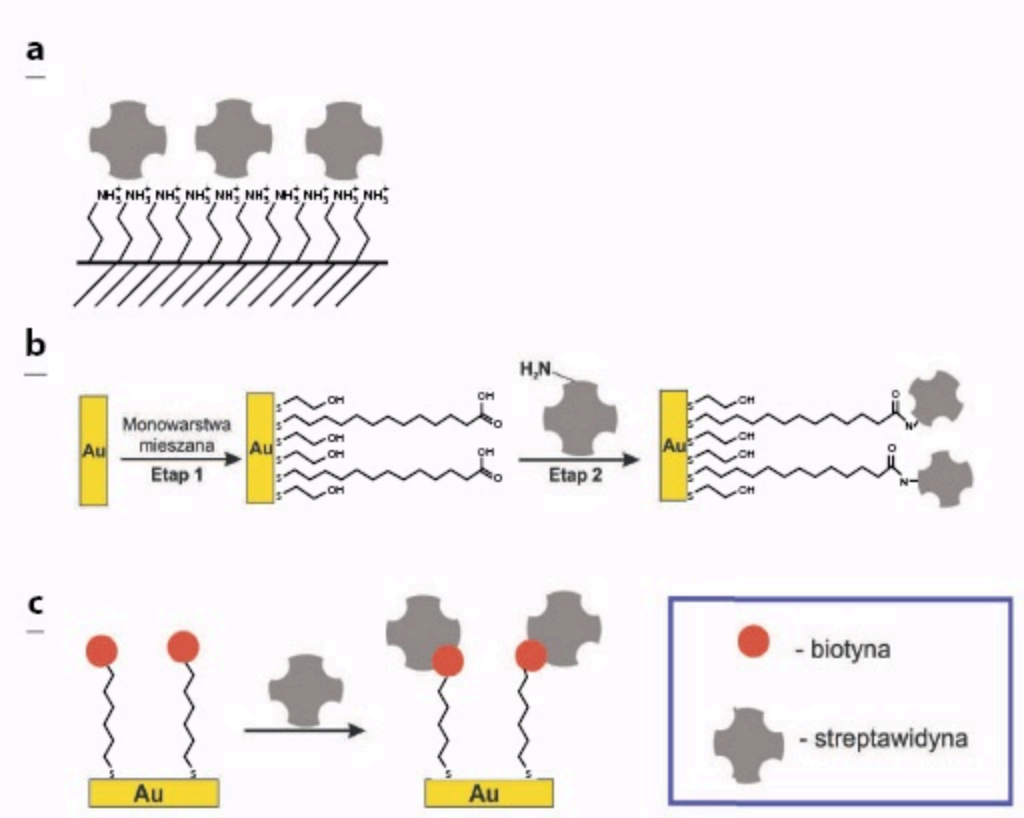
W technice pułapkowania w matrycy wykorzystuje się polimery organiczne rozpuszczalne w wodzie (np. akrylamid) lub w rozpuszczalnikach organicznych (np. polipirol – polimer przewodzący stosowany w biosensorach elektrochemicznych). Kwasy nukleinowe mogą oddziaływać z taką matrycą zarówno z wytworzeniem wiązań kowalencyjnych (eliminacja desorpcji z powierzchni elektrody), jak i zostać w niej unieruchomione w sposób fizyczny. Dzięki tej metodzie uzyskuje się warstwę receptorową, w której kwasy nukleinowe są ułożone w więcej niż jednej warstwie, co prowadzi do wyraźnego zagęszczenia miejsc wiązania analitu podlegającego detekcji [79]. Trudność w uzyskaniu

porów o ściśle określonej wielkości utrudnia zarówno dostęp analitów do kwasów nukleinowych, jak i zachodzenie zmian w ich konfiguracji przestrzennej. Sytuację tą poprawia enkapsulacja funkcjonalnych kwasów nukleinowych, dedykowanych do oznaczania analitów o niewielkich rozmiarach, w matrycach krzemionkowych otrzymanych metodą zol–żel [92]. Oligonukleotydy w metodzie tej są zatrzymywane w sposób fizyczny lub z wykorzystaniem na tyle słabych oddziaływań, że nie wpływają one na sposób oddziaływania kwasów nukleinowych z dedykowanymi analitami. W układzie zol–żel są obecne otwarte pory pełniące funkcje kanałów, przez które małe cząsteczki dostają się do obecnych w matrycy fragmentów DNA i/lub RNA. Należy zwrócić uwagę, że taki sposób unieruchamiania kwasów nukleinowych poprawia ich odporność na degradację biologiczną (enzymy są zbyt duże, aby dotrzeć przez pory do funkcjonalnych kwasów nukleinowych). Układ poprawia również, poprzez sterowanie wielkością występujących porów (odpowiednie prekursory i domieszki), selektywność opracowywanego czujnika [79, 92].

Powinowactwo chemiczne

Dostęp do szerokiej gamy chemicznych modyfikacji oligonukleotydów umożliwił unieruchamianie ich na podłożu stałym w sposób ściśle ukierunkowany. Wyróżnia się tutaj wiązanie poprzez powinowactwo oraz tworzenie wiązań kowalencyjnych [79]. Aby uzyskać tego typu warstwy receptorowe biosensorów, niezbędna jest, jak już wspomniano, modyfikacja immobilizowanej sondy i/lub

podłoża. W przypadku pierwszej z wymienionych technik korzysta się praktycznie wyłącznie z bardzo silnego oddziaływania między biotyną (witamina H lub B_7) a awidyną (stała dysocjacji rzędu 10^{-15} mol·dm^{-3}). Biotyna to niewielki związek organiczny będący koenzymem enzymów z grupy karboksylaz. Z kolei awidyna (wykorzystuje się również streptoawidynę) to białko, masa ok. 70 kD, składające się z czterech łańcuchów polipeptydowych, z których każdy wiąże jedną cząsteczkę biotyny. W literaturze podaje się przykłady warstw receptorowych, w których biotyna jest przyłączona do unieruchamianej sondy DNA, natomiast awidyna jest unieruchamiana na przetworniku poprzez adsorpcję (rys. 5.11a) [93], z utworzeniem wiązań kowalencyjnych [94] (rys. 5.11 b) lub w wyniku powinowactwa do unieruchomionej na powierzchni biotyny [95] (rys. 5.11c). Mimo wysokiej stabilności takiego układu, zastosowanie białka często powoduje blokowanie powierzchni i uniemożliwia przewodnictwo elektronowe. Ogranicza to zatem możliwość stosowania go wraz z detekcją elektrochemiczną. Z kolei przetwornik złoty w przypadku biosensorów DNA, w których sygnałem jest fluorescencja, również nie jest idealny (wygaszanie fluorescencji) [96]. Rozważając zatem konstrukcję opracowywanego biosensora, zawsze należy brać pod uwagę możliwości oraz wady, jakie oferują zarówno materiał, z jakiego jest wykonany przetwornik, jak i dostępne dla niego sposoby immobilizacji [97].



RYS. 5.11

Przykłady unieruchamiania streptawidyny w wyniku: a) adsorpcji, b) z wytworzeniem wiązań kowalencyjnych, c) w wyniku powinowactwa do biotyny

Immobilizacja z wykorzystaniem wiązań kowalencyjnych

Unieruchamianie kwasów nukleinowych na podłożach stałych w wyniku utworzenia wiązania kowalencyjnego między grupą funkcyjną wprowadzoną do sondy a sfunkcjonalizowaną powierzchnią wydaje się najbardziej uniwersalnym sposobem immobilizacji. Chodzi tutaj nie tylko o swobodę w wykorzystywaniu

technik detekcji. Unika się przede wszystkim „uwalniania” sond do roztworu czy problemów z transportem masy, co ma miejsce w przypadku unieruchamiania w tzw. strukturach trójwymiarowych (polimery, enkapsulacja). Ponadto z uwagi na możliwość wyeliminowania niespecyficznej adsorpcji cząstek warstwy receptorowej w znacznym stopniu są redukowane szumy oraz fałszywa odpowiedź biosensora. Energia, jaką należałoby dostarczyć w celu rozerwania wiązania kowalencyjnego, jest na tyle duża, że kilkukrotne odmywanie powierzchni przetwornika (usuwanie niespecyficznie zaadsorbowanych cząstek) czy wymiana roztworu, w którym są prowadzone badania nie prowadzi do „zmycia” utworzonej warstwy receptorowej. To z kolei umożliwia opracowywanie metod jej regeneracji, a zatem i urządzeń, które mogłyby zostać wykorzystywane wielokrotnie.

Kwasy nukleinowe nie tworzą z powierzchnią przetworników wiązań kowalencyjnych w sposób samoczynny. Konieczna jest modyfikacja bądź samych składników warstwy receptorowej bądź/i funkcjonalizacja powierzchni. Zazwyczaj przetwornik wybiera się pod kątem generowania odpowiedniego sygnału analitycznego, co narzuca materiał z jakiego jest wykonany, a zatem i konieczność korzystania z odpowiedniej metody funkcjonalizacji. Dlatego też unieruchamianie warstwy receptorowej wymaga po pierwsze wyboru reakcji, która zostanie wykorzystana do kowalencyjnego dowiązywania oligonukleotydów, po drugie przygotowania powierzchni przetwornika (funkcjonalizacji powierzchni/sondy), aby można było wybrany typ reakcji przeprowadzić [79].

Chemisorpcja – samoorganizujące się monowarstwy

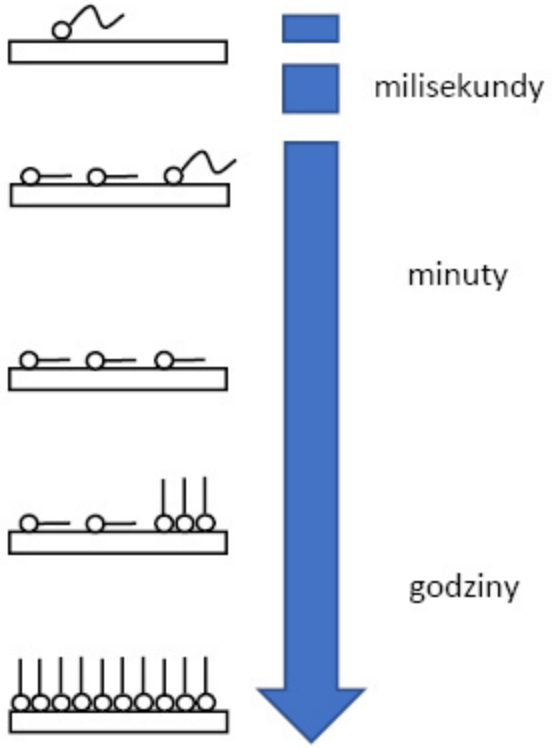
Czyste powierzchnie metali oraz tlenków metali spontanicznie adsorbują cząsteczki organiczne, co prowadzi do zmniejszenia energii swobodnej obszaru międzyfazowego, jaki występuje między tą powierzchnią a otoczeniem [98]. Zjawisko to prowadzi tym samym do zmiany właściwości przestrzeni międzyfazowej. W zależności od rodzaju cząstek organicznych może to być np. fizyczna lub elektrostatyczna osłona przed agregacją cząstek metalicznych, warstwa zmniejszająca reaktywność atomów występujących na powierzchni metalicznej czy też warstwa izolująca elektrycznie [98]. Samoorganizujące się monowarstwy (*self-assembled monolayers*, SAMs), oferują zatem prostą a zarazem wyjątkowo elastyczną metodę „regulowania" właściwości powierzchni metali, tlenków metali czy półprzewodników. SAMs to zespoły powstające w wyniku adsorpcji cząsteczek organicznych z fazy wodnej lub gazowej na powierzchniach ciał stałych lub tworzące regularne układy na powierzchniach cieczy (np. rtęć). Zaadsorbowane cząsteczki spontanicznie organizują się w sieci krystaliczne lub półkrystaliczne. Cząsteczki organiczne tworzące SAM mają grupy funkcyjne charakteryzujące się wysokim powinowactwem do materiału, z którego jest wykonana powierzchnia docelowa. Oddziaływanie to jest na tyle duże, że niejednokrotnie może prowadzić nawet do desorpcji zabrudzeń z powierzchni. Opisano szereg grup funkcyjnych oraz dedykowanych im metali, tlenków metali czy półprzewodników, przy czym

najbardziej popularną klasą monowarstwy samoorganizującej się jest adsorpcja alkanotioli na powierzchni wykonanej ze złota, srebra, miedzi, platyny, palladu lub rtęci.

Bardzo wysokie powinowactwo tioli do metali szlachetnych oraz stopów monetowych umożliwia tworzenie na ich powierzchni dobrze zorganizowanej warstwy organicznej „wyposażonej" w użyteczny w konkretnym zastosowaniu element skierowany do przestrzeni międzyfazowej. Sam proces formowania monowarstw tiolowych na powierzchni złota odbywa się kilkuetapowo (rys. 5.12).

Początkowo tworzy się monowarstwa cząsteczek zaadsorbowanych na drodze fizykochemicznej (oddziaływania van der Waalsa). Stan ten trwa zaledwie kilka milisekund, a grupy tiolowe cząsteczek niemal natychmiast zaczynają reagować z powierzchnią złota, tworząc wiązania kowalencyjne Au–S z wydzieleniem wodoru:

$$RSH + Au \leftrightarrow RS - Au + e^{-} + H^{+} \tag{5.1}$$



RYS. 5.12
Mechanizm formowania monowarstwy

Następuje wysycenie powierzchni przez cząsteczki, których grupa tiolowa jest unieruchomiona w sposób kowalencyjny, a reszta (łańcuch) oddziałuje niespecyficznie. Siła oddziaływania między siarką a złotem prowadzi jednak do desorpcji niespecyficznie związanego z powierzchnią fragmentu cząsteczki i unieruchomienie kolejnej z roztworu na zasadzie chemisorpcji. Proces ten, nazywany samoorganizacją, może trwać już jednak od kilku do kilkunastu godzin.

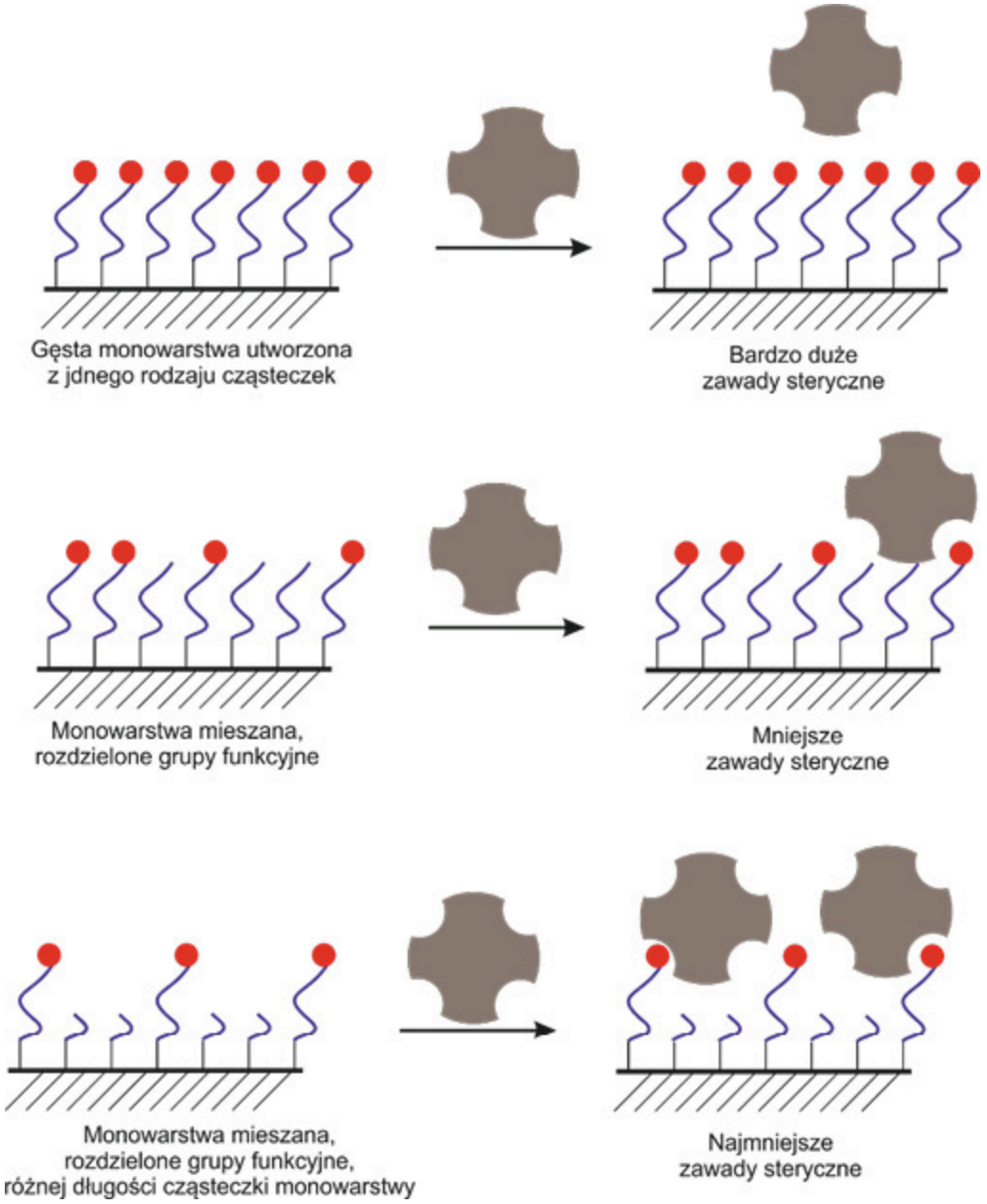
W wyniku takiego przestrzennego orientowania cząsteczek coraz większe znaczenie w trwałości monowarstwy zaczynają mieć oddziaływania między ich resztami, orientowanymi w stronę roztworu [99].

W wielu zastosowaniach monowarstw wystarczy, jeśli będzie się ona składać wyłącznie z jednego rodzaju cząsteczek (np. regulacja zwilżalności powierzchni [100], przyczepności do niej [101], odporności na działanie chemikaliów [102]). Jednak w przypadku biosensorów mamy do czynienia z rozpoznawaniem przez warstwę receptorową analitów. W wielu przypadkach może to prowadzić do zmiany konformacji cząsteczek tworzących warstwę bioczułą. Aby jednak mogła ona zajść, niezbędne jest zarówno umożliwienie dostępu analitom, jak i pozostawienie odpowiednio dużo miejsca właśnie na konieczność zmian przestrzennych wywołanych „bioczuciem" (np. hybrydyzacja DNA–DNA [103,104] czy zwijanie się aptamerów [105]). Między innymi w tym celu tworzone są monowarstwy mieszane (rys. 5.13). Jak można zaobserwować, wraz ze zwiększającą się różnicą w wielkości cząstek warstwy bioczułej oraz oddalaniem się grup funkcyjnych następuje redukcja zawad sterycznych, a tym samym zwiększenie prawdopodobieństwa zajścia reakcji specyficznej dla danego układu analitycznego.

Należy jednak pamiętać, że zmniejszanie udziału w warstwie receptorowej elementów odpowiedzialnych za bioczucie będzie prowadziło do zmniejszania się liczby cząsteczek analitu związanego lub przetworzonego przez taką monowarstwę. To z kolei będzie ograniczało sygnał analityczny. Bardzo ważne jest zatem takie dobranie stężenia poszczególnych elementów monowarstwy, aby uzyskać optymalną wydajność reakcji zachodzącej na powierzchni przetwornika. Bardzo dobrym przykładem może być tutaj wpływ upakowania sond DNA na wydajność hybrydyzacji (rys. 5.14) [107].

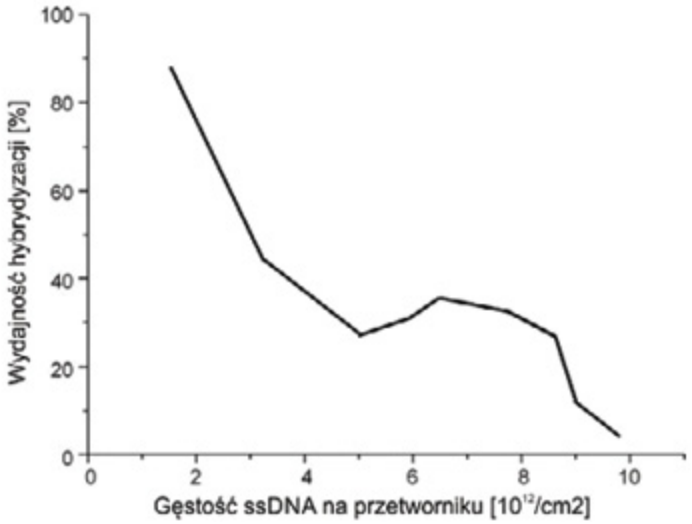
Ważne z punktu widzenia warstw receptorowych biosensorów jest to, że cząsteczki tworzące samoorganizujące się monowarstwy

mogą składać się z kilku części. W przypadku klasycznych biosensorów DNA jest to grupa silnie wiążąca się z podłożem, fragment przejściowy między grupą łączącą a łańcuchem DNA oraz z samej sekwencji DNA. Dzięki możliwości modyfikacji nici kwasów nukleinowych m.in. grupami tiolowymi sprzężonymi poprzez łańcuch alkilowy, bardzo dobrą techniką okazało się bezpośrednie nakroplenie na powierzchnię złota roztworu takiego oligonukleotydu.



RYS. 5.13

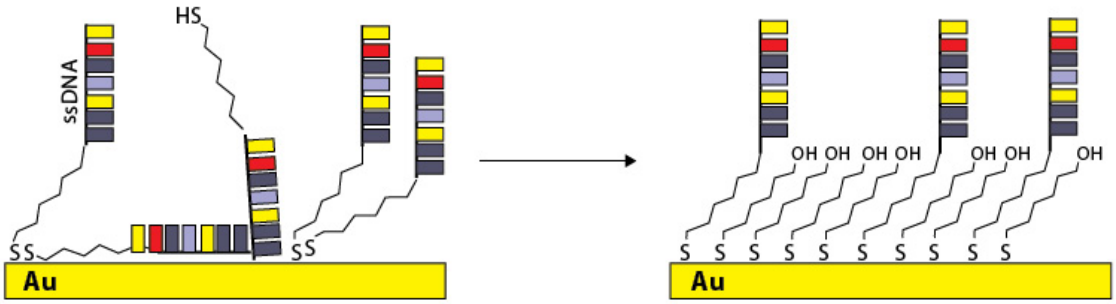
Monowarstwa mieszana oraz jej wpływ na redukcję zawad sterycznych występujących w warstwie bioczułej [106]



Gęstość sond [sond·cm^{-2}]	Opis
≤ 4·10^{12}	wzrost wydajności hybrydyzacji
> 4,5·10^{12}	gwałtowny spadek sygnału hybrydyzacji
≤ 3·10^{12}	optymalna dla biosensorów kinetyka hybrydyzacji

RYS. 5.14

Wpływ stężenia sond ssDNA unieruchomionych na powierzchni przetwornika na wydajność procesu hybrydyzacji z sekwencją komplementarną [107]



RYS. 5.15

Schemat unieruchamiania oligonukleotydów modyfikowanych grupami alkilotiolowymi oraz organizacja monowarstwy w wyniku unieruchomienia 6-merkapto-1-heksanolu [106]

5.4.4 Mechanizmy generowania sygnału w biosensorach elektrochemicznych z warstwą receptorową w postaci kwasów nukleinowych

Przykłady mechanizmów oddziaływań monowarstw zawierających oligonukleotydy z analitami prowadzące do wygenerowania elektrochemicznego sygnału analitycznego można podzielić na trzy grupy:

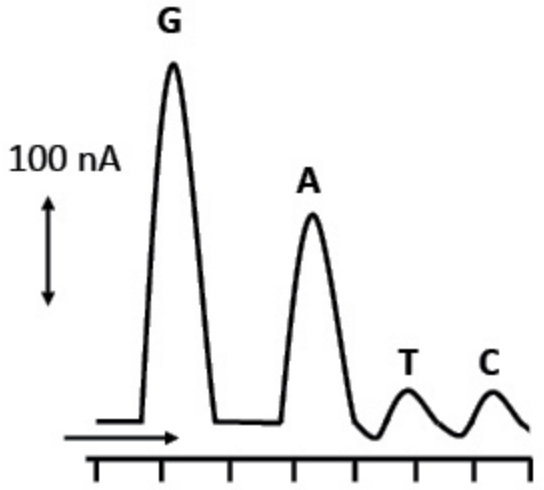
- bezpośrednia detekcja zasad azotowych bazująca na ich właściwościach redoks,
- dodanie do roztworu znacznika redoks oddziałującego z nicią(mi) kwasu nukleinowego,
- detekcja markera redoks kowalencyjnie dowiązanego do nici kwasu nukleinowego [108, 109].

Kwasy nukleinowe to związki redoksaktywne [109], w których dodatkowe występuje transport elektronów oraz dziur elektronowych wzdłuż podwójnej nici DNA. Zjawisko to stanowi naturalny mechanizm obronny przed skutkami promieniowania UV [110]. Dodatkowo zostało również wykorzystane w konstrukcji wielu układów analitycznych z zastosowaniem oligonukleotydów.

Bezpośrednia detekcja zasad azotowych bazująca na ich właściwościach redoks

Najprostszym, ale i najmniej czułym mechanizmem zmian konformacyjnych bądź stężenia kwasów nukleinowych zachodzących na powierzchni elektrody, jest wykorzystanie właściwości redoks samych zasad azotowych (rys. 5.16).

Właściwości te wykorzystano m.in. w biosensorze hybrydyzacji DNA-DNA [111] (rys. 5.17 I) oraz biosensorze do oznaczania greliny (28-aminokwasowego hormonu peptydowego), w którym warstwę receptorową stanowiły aptamery zbudowane z L-RNA (rys. 5.17 II) [112]. Należy jednak pamiętać, że, aby możliwe było uzyskanie sygnału od utleniania zasad azotowych, niezbędna jest ich adsorpcja na powierzchni elektrody.



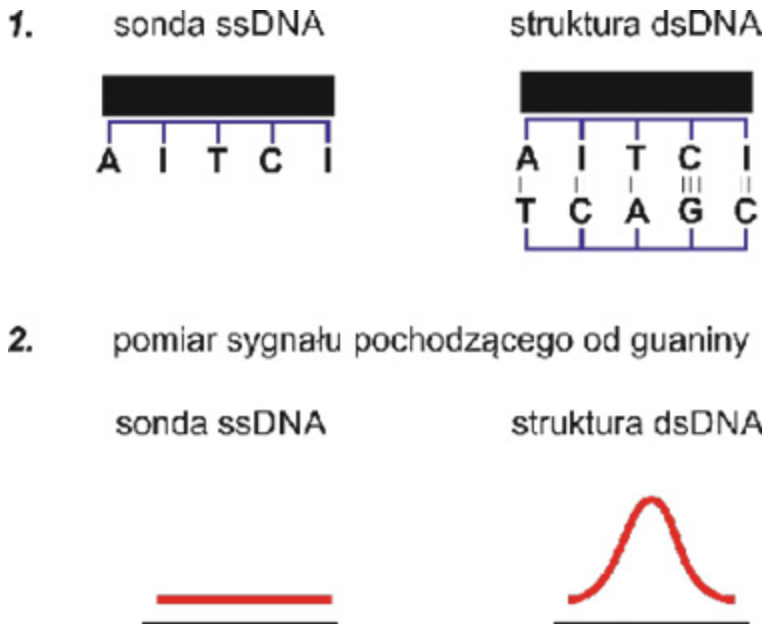
RYS. 5.16

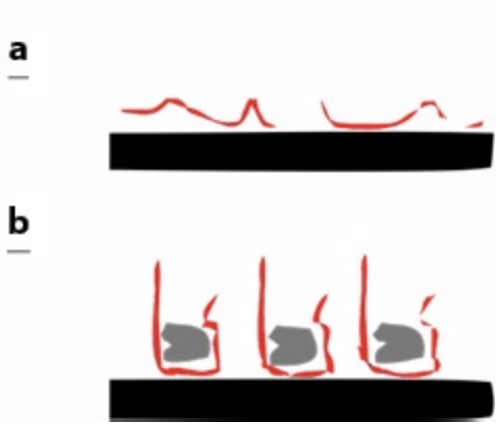
Potencjały utleniania zasad azotowych w równomolowej mieszaninie (20

μmol·dm^{-3}) guaniny, adeniny, tyminy oraz cytozyny (pH 7,4; 0,1 mol·dm^{-3} bufor fosforanowy) wysokość pulsu 50 mV; szerokość pulsu 70 ms; szybkość skanowania 5 mV·s^{-1}. Wartości potencjałów podawane w stosunku do elektrody Ag/AgCl) [110]

Sondę biosensora hybrydyzacji stanowiły oligonukleotydy, w których guaninę podstawiono inozyną, nukleotydem tworzącym podobnie jak guanina wiązania wodorowe z cytozyną. Z uwagi na inny (nieco wyższy) potencjał utleniania inozyny w porównaniu do guaniny możliwe było wykazanie oraz ilościowe przełożenie sygnału redoks guaniny w zależności od stopnia hybrydyzacji nici oznaczanej z sondą unieruchomioną na powierzchni przetwornika [113].

I) II)





RYS. 5.17

Schemat działania biosensora I) hybrydyzacji DNA-DNA oraz II) dedykowanego do oznaczenia greliny [112]

Jak wspomniano powyżej, sygnał prądowy pochodzący od utleniania guaniny wykorzystano również w biosensorze dedykowanym do oznaczania greliny. W tym wypadku zmiana ilości zasad guaninowych na powierzchni przetwornika wynikała ze zmian konformacyjnych zaadsorbowanych na powierzchni elektrody aptamerów w wyniku związania greliny. Oddalenie od powierzchni elektrody fragmentów nici kwasów nukleinowych oraz obserwowany spadek natężenia prądu utleniania guaniny, a także przesunięcie wartości potencjału potwierdzało związanie greliny przez aptamer oraz umożliwiało przełożenie tych wartości na ilościowe zmiany peptydu w roztworze [112].

Opisany mechanizm umożliwia prowadzenie oznaczeń bez konieczności modyfikacji nici kwasów nukleinowych, co z pewnością upraszcza samą konstrukcję biosensora oraz redukuje koszty z tym związane. Układy takie są jednak jednorazowe, a sam sygnał jest dość słaby i zależy od obecności guaniny w sekwencji unieruchomionej sondy, co, jak można przypuszczać, eliminuje go

z wielu zastosowań. Wykorzystanie znaczników redoks uniezależniających uzyskiwany sygnał prądowy od sekwencji nukleotydowej przy jednoczesnym zwiększeniu jego intensywności jest zatem bardzo użytecznym rozwiązaniem.

Znacznik redoks oddziałujący z nicią (nićmi) kwasu nukleinowego

Detekcja procesów zachodzących na powierzchni elektrod biosensorów kwasów nukleinowych może być oparta nie tylko na bezpośredniej elektrochemii DNA czy RNA. Znacznie więcej doniesień literaturowych przedstawia układy, w których jest oznaczany znacznik redoks specyficznie oddziałujący z jedno- lub dwuniciowym kwasem nukleinowym. Znaczniki, w zależności od własnej budowy cząsteczkowej, mogą oddziaływać z tzw. rowkiem podwójnej nici DNA (obszarem, w którym występują potencjalne donory oraz akceptory wodoru w wiązaniach wodorowych), na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych z ujemnie naładowanym szkieletem fosforanowo-cukrowym bądź w wyniku interkalacji (rys. 5.18, tabela 5.2) [113]. Cząsteczki związków interkalujących pomiędzy pary płaskich zasad azotowych w podwójnej nici DNA (najczęściej pary G ≡ C) mają zazwyczaj kilka płaskich sprzężonych ze sobą pierścieni [114]. Z kolei związki wiążące się z mniejszym bądź większym rowkiem DNA są zbudowane z pierścieni aromatycznych typu pirol, furan czy benzen połączonych wiązaniami umożliwiającymi im drgania skrętne. Większość wykorzystywanych dotychczas związków oddziałujących z rowkami dwuniciowych

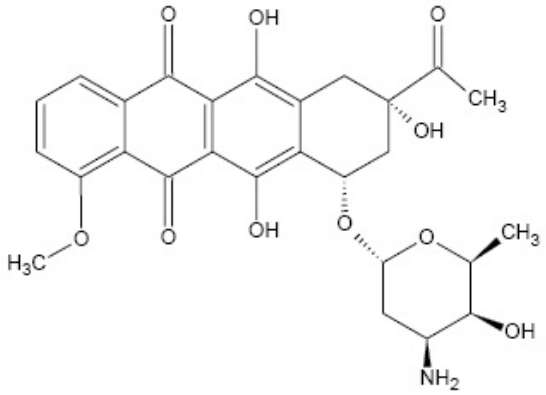
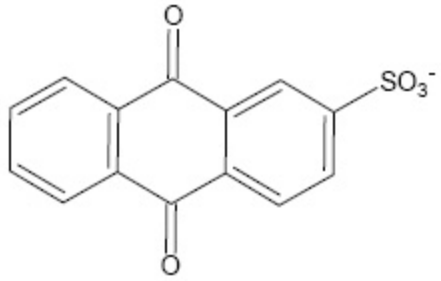
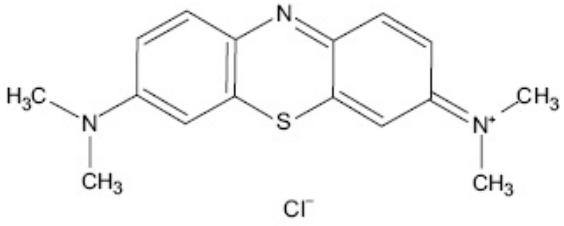
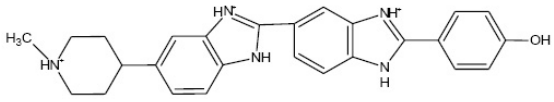
kwasów nukleinowych wykazywało większe powinowactwo do fragmentów zawierających pary zasad A i T [115].

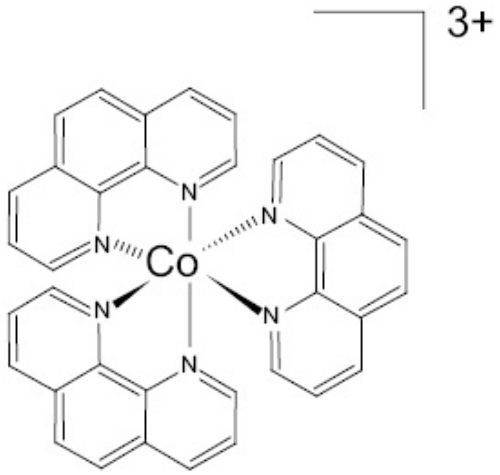
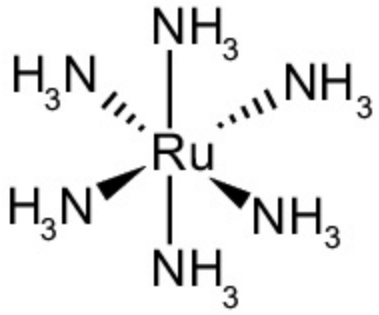
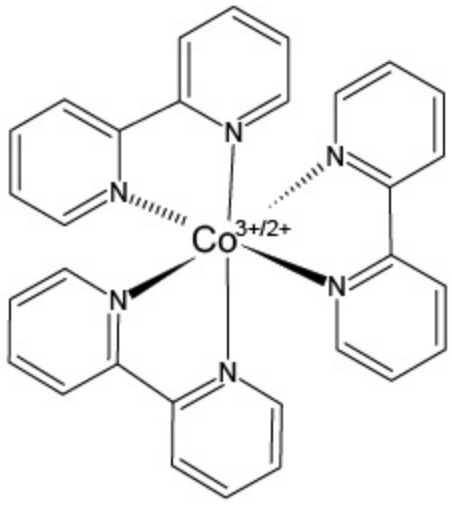
RYS. 5.18

Schematyczne przedstawienie sposobu oddziaływania znaczników redoks z podwójną nicią DNA [113]

TABELA 5.2

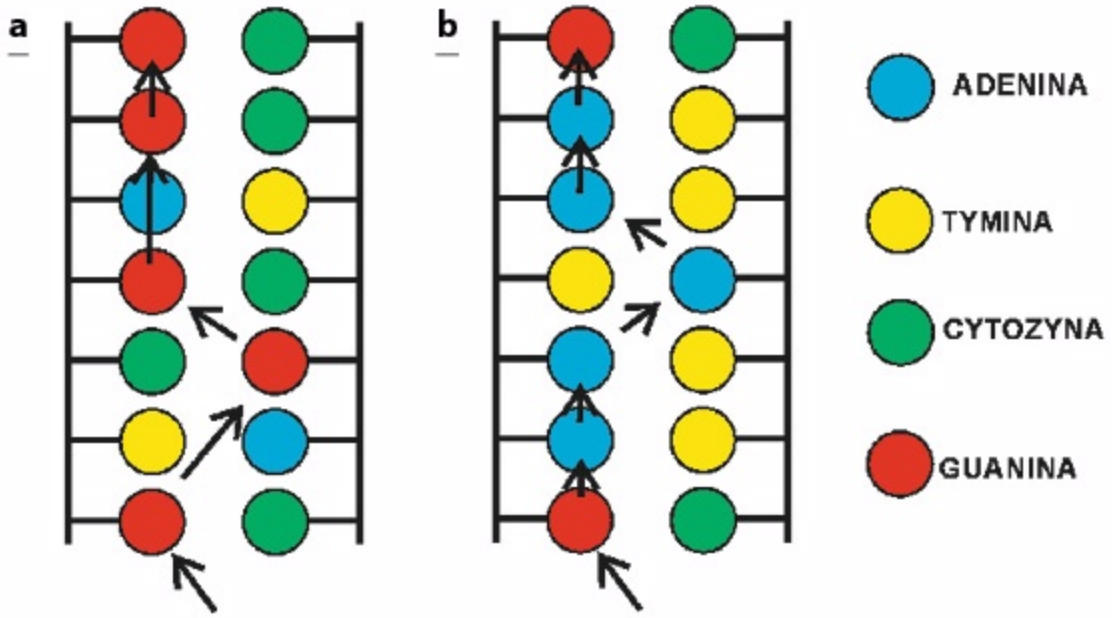
Przykłady związków oddziałujących z nićmi kwasów nukleinowych

Związki interkalujące		
Daunorubicyna		[116]
Pochodne antrachinowe np. kwas antrachinylo-2-sulfonowy (AQMS)		[117]
Błękit metylenowy		[117]
Związki oddziałujące z rowkiem podwójnej nici kwasów nukleinowych		
Hoechst 33258		[118]

$Co(phen)_3^{3+}$		[100]
Związki oddziałujące elektrostatycznie		
$Ru(NH_3)_6^{3+}$		[104]
$Co(bpy)_3^{3+}$		[119]

Podstawowym zjawiskiem wykorzystywanym w większości tego typu układów jest możliwość transportowania przez w pełni

komplementarne dwuniciowe kwasy nukleinowe elektronów i dziur elektronowych. Proces przenoszenia ładunku wzdłuż podwójnej helisy na odległości dochodzące do 200 Å (w zależności od sekwencji) jest jednym z naturalnych mechanizmów obronnych przed promieniowaniem UV (najczęściej dochodzi do uszkodzeń w obszarach zawierających obok siebie dwie pirymidyny, np. tyminy) [110]. Jak już wyżej wspomniano, guanina jest najbardziej podatną na procesy redoks zasadą w DNA, stąd pierwsza teoria transportu ładunku dodatniego dotyczyła przewodnictwa tzw. G-hoppingowego. W przypadku przerwy między guaninami wynoszącej więcej niż 4 nukleotydy, zaproponowano dodatkowo: przewodnictwo A-hoppingowe (zasada adeninowa) (rys. 5.19).



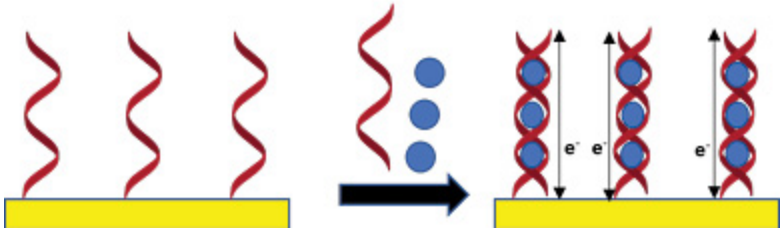
RYS. 5.19

Mechanizm transportu dziur elektronowych wzdłuż podwójnej nici DNA: a) przewodnictwo G-hoppingowe; b) przewodnictwo A-hoppingowe

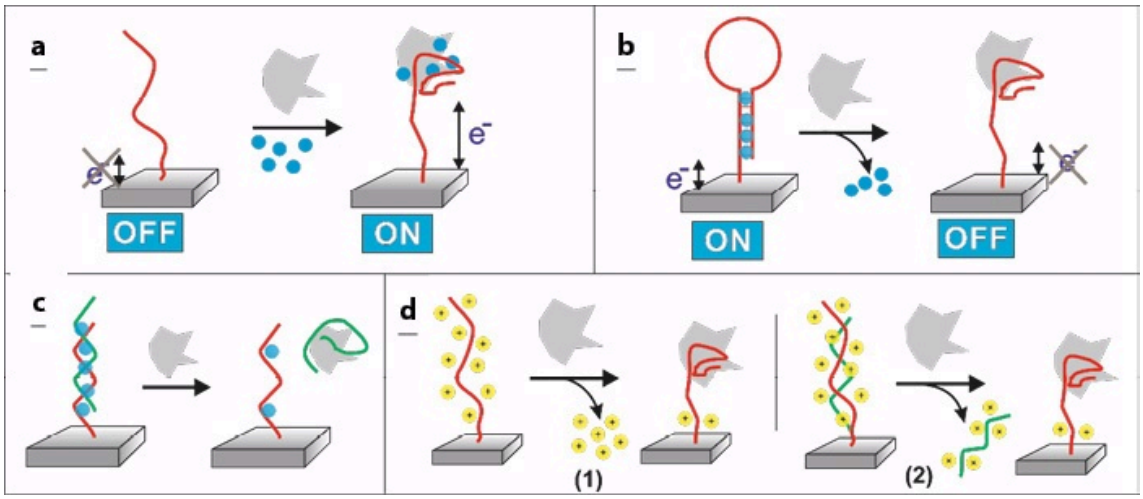
Z kolei elektrony są przenoszone głównie za pośrednictwem zasad pirymidynowych (cytozyna, tymina), ponieważ różnica potencjału redoks między nimi jest mniejsza niż między guaniną a adeniną (stąd też sekwencja DNA nie ma tak dużego wpływu na transport elektronów jak na transport dziur elektronowych). Obszary w DNA niekodujące informacji genetycznej, tzw. introny, są bogate w guaniny. Badania wykazały, że spośród układów jednej, dwu oraz trzech guanin umieszczonych obok siebie w intronie, najłatwiej dochodzi do utlenienia środkowej guaniny w układzie GGG. Sekwencje takie, mimo, że występują w ilości około 2 na 100 par zasad intronu, bardzo wydajnie przechwytują ładunki dodatnie. Dochodzi wówczas do uszkodzenia tego typu sekwencji, które następnie jest naprawiana z wykorzystaniem typowego mechanizmu, w którym biorą udział również enzymy [110].

W zależności od wykorzystanego znacznika można wybrać jeden z kilku mechanizmów detekcji biosensorów zawierających w warstwie receptorowej kwasy nukleinowe (rys. 5.20) [120].

I)



II)



RYS. 5.20

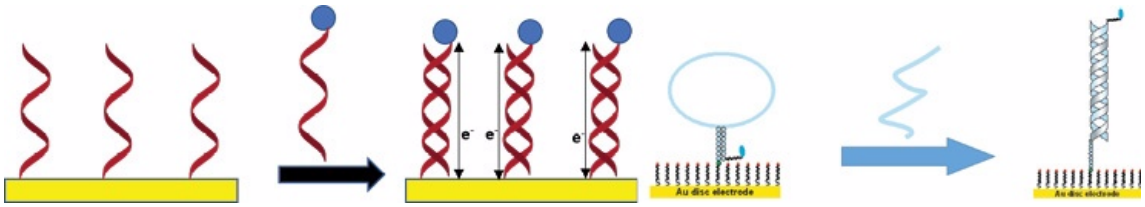
Przykłady mechanizmów prowadzących do powstania sygnału analitycznego w biosensorach: I) hybrydyzacji DNA-DNA oraz w II) aptasensorach: znacznik oddziałujący z kompleksem aptamer-analit (a), znacznik interkalujący (b), znaczniki oddziałujące z nićmi kwasów nukleinowych (c) znaczniki elektrostatyczne (d1, d2) [120]

Rodzaj znacznika redoks powinien być dobrany, biorąc pod uwagę możliwość zmiany ułożenia warstwy receptorowej na powierzchni przetwornika, a także warunki zapewniające stabilność warstwy oligonukleotydowej. W każdym z wymienionych przykładów idealnie byłoby, gdyby znacznik oddziaływał z kwasami nukleinowymi tylko w jeden, ściśle jemu przypisany sposób. Niestety, selektywność znaczników redoks jest stosunkowo niska. Dotyczy to nie tylko związków oddziałujących elektrostatycznie czy też wiążących się w rowku podwójnej nici, ale także znaczników interkalujących (oddziaływania również z jednoniciowym fragmentem oligonukleotydu). W celu wyeliminowania tych niedogodności w pomiarach stosuje się sygnał różnicowy (różnica powinowactwa danego znacznika do poszczególnych form DNA/RNA).

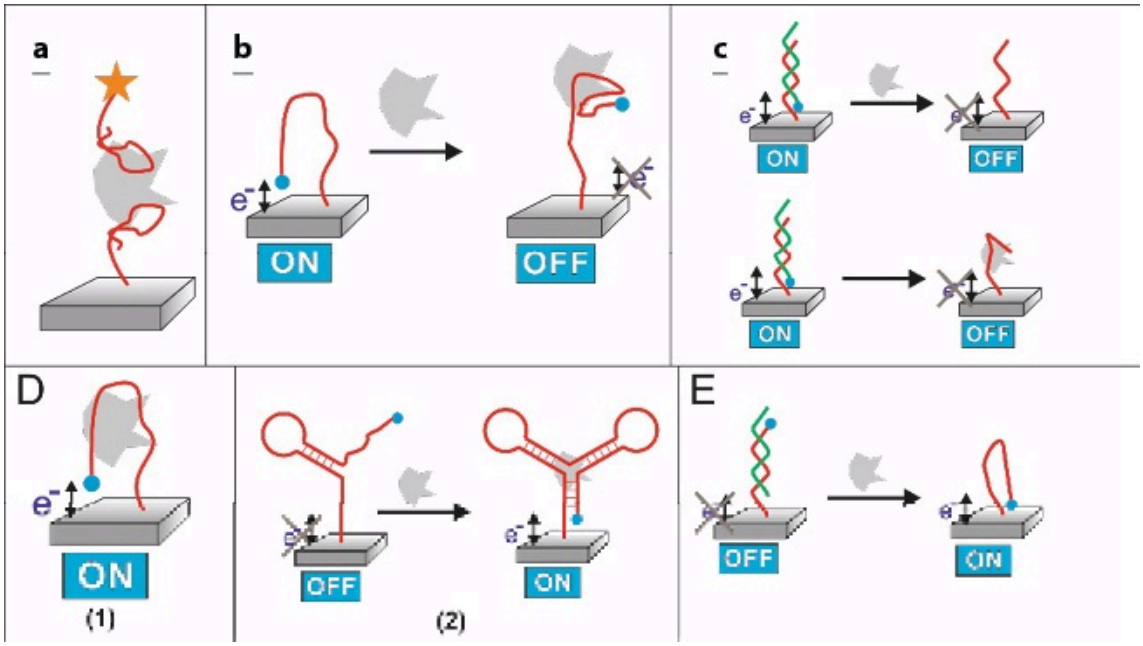
Znacznik redoks kowalencyjnie dowiązany do nici kwasu nukleinowego

Znaczna redukcja wyników fałszywie dodatnich, jakie mogą wystąpić w przypadku znaczników dodawanych do roztworu reakcyjnego i oddziałujących z kwasami nukleinowymi, jest możliwa w przypadku znaczników dowiązanych kowalencyjnie (rys. 5.21).

I)



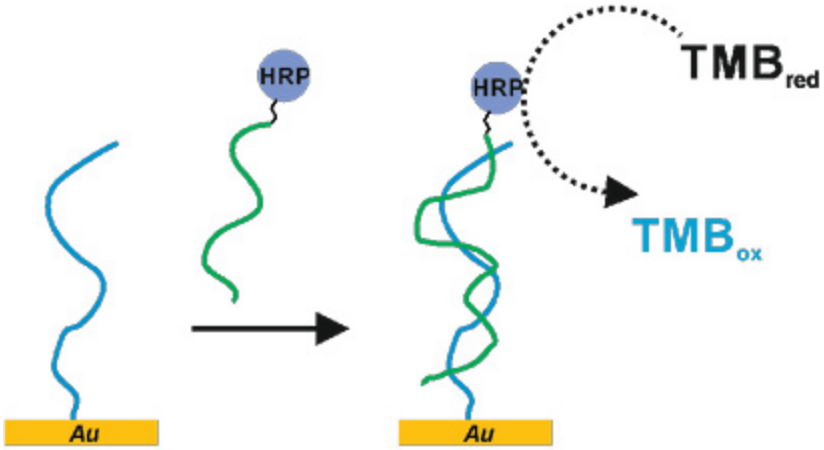
II)



RYS. 5.21

Przykłady mechanizmów prowadzących do powstania sygnału analitycznego w biosensorach (I) hybrydyzacji DNA-DNA oraz (II) aptasensorach: biosensor „kanapkowy” (a); zanik sygnału analitycznego w wyniku zmian konformacyjnych po związaniu analitu (b) lub denaturacji nici podwójnej (c1, c2); sygnał analityczne generowany w wyniku zmian konformacyjnych aptameru (d1, d2) lub denaturacji nici podwójnej (e) [117, 120]

Jak można zaobserwować na rysunku 5.21, sygnał analityczny jest uzyskiwany wyłącznie od znacznika związanego z nicią kwasu nukleinowego. W większości przypadków detekcja analitu wyklucza zatem jakiekolwiek niespecyficzne oddziaływania. Z drugiej strony, ponieważ intensywność sygnału jest wprost proporcjonalna do stężenia kwasów nukleinowych na elektrodzie, wartości rejestrowanego natężenia prądu są zdecydowanie niższe od tego, jakie można uzyskać w przypadku znacznika dodawanego do roztworu. Sytuację tę poprawia np. znakowanie nici kwasów nukleinowych enzymami katalizującymi reakcje zmieniające stężenie znacznika redoks w roztworze (rys. 5.22).



RYS. 5.22

Przykład amplifikacji sygnału biosensora elektrochemicznego

z zastosowaniem znakowania nici kwasu nukleinowego enzymem katalizującym reakcje redoks [79]

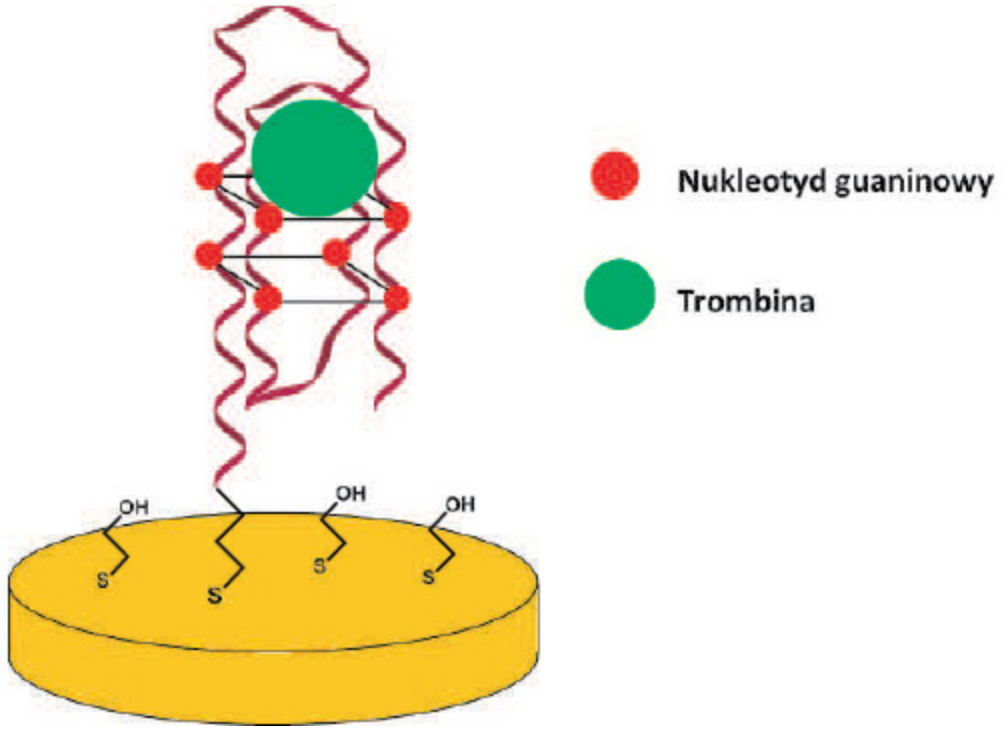
W przypadku aptamerów użycie sekwencji znakowanej wymaga przede wszystkim znajomości sposobu zmiany konformacji sekwencji, która została określona dla wybranych sekwencji specyficznych, np. na trombinę, płaskonabłonkowy czynnik wzrostu (PDGF) czy dopaminę. Należy jednak podkreślić, że dowiązanie znacznika o właściwościach optycznych czy elektroaktywnych jest procesem złożonym i kosztownym.

W ciągu kilkudziesięciu lat zostały opracowane liczne biosensory, których warstwę receptorową stanowią cząsteczki kwasów nukleinowych. Z uwagi na szeroki zakres ich zastosowania, w dalszej części rozdziału przedstawiono kilka przykładów ich użycia. Szczególnie interesująca wydaje się możliwość wykorzystania jako warstw receptorowych cząsteczek aptamerów oraz kwasów nukleinowych, które pozwalają na oznaczenie analitów różnej klasy.

5.4.5
Przykłady aptasensorów

Pierwszy opisany w literaturze elektrochemiczny aptasensor wykorzystano do wykrycia trombiny. W tym celu jako warstwę receptorową zastosowano 15- nukleotydowy aptamer zawierający grupę tiolową na końcu 3′, który zaimmobilizowano na powierzchni złotej elektrody. W obecności białka – trombiny doszło do zmiany konformacji aptameru i przyjęcia przez niego struktury tzw. G-kwadrupleksu, która była stabilizowana przez cząsteczki trombiny.

Tak opracowany aptasensor pozwolił na wykrycie trombiny w zakresie stężeń od 5 do 35 nM. Należy podkreślić, że struktura G-kwadrupleksu nie jest tworzona jedynie w obecności trombiny, gdyż takie właściwości wykazują również jony potasu i ołowiu [121].

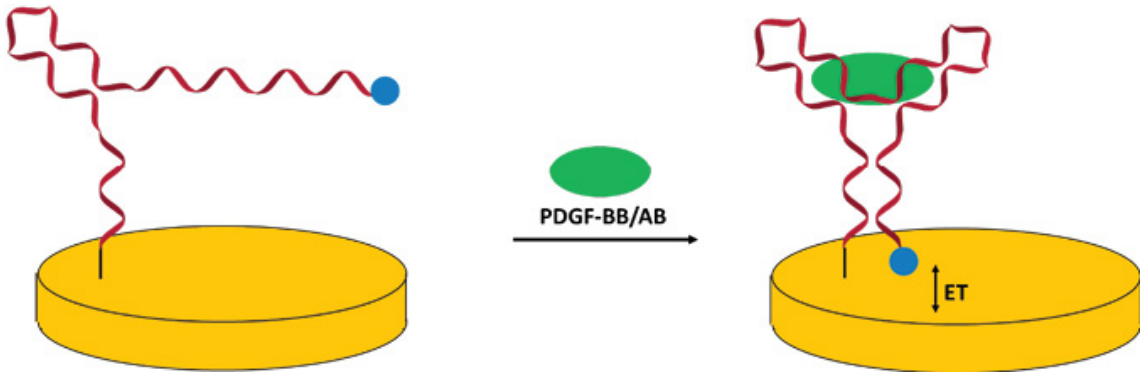


RYS. 5.23

Schemat struktury kwadrupleksowej stabilizowanej w obecności trombiny

Innym przykładem aptasensora jest układ do wykrywania płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF), który może stanowić biomarker chorób nowotworowych. Warstwę receptorową biosensora stanowił 35-nukleotydowy aptamer DNA, który na końcu 5′ był zmodyfikowany grupą tiolową, co umożliwiło kowalencyjne dowiązanie do powierzchni złota. Koniec 3′ sekwencji był z kolei związany z cząsteczką błękitu metylenowego, który stanowił źródło sygnału analitycznego. Nici aptamerowe przy braku PDGF były częściowo rozwinięte i nieuporządkowane, natomiast w wyniku

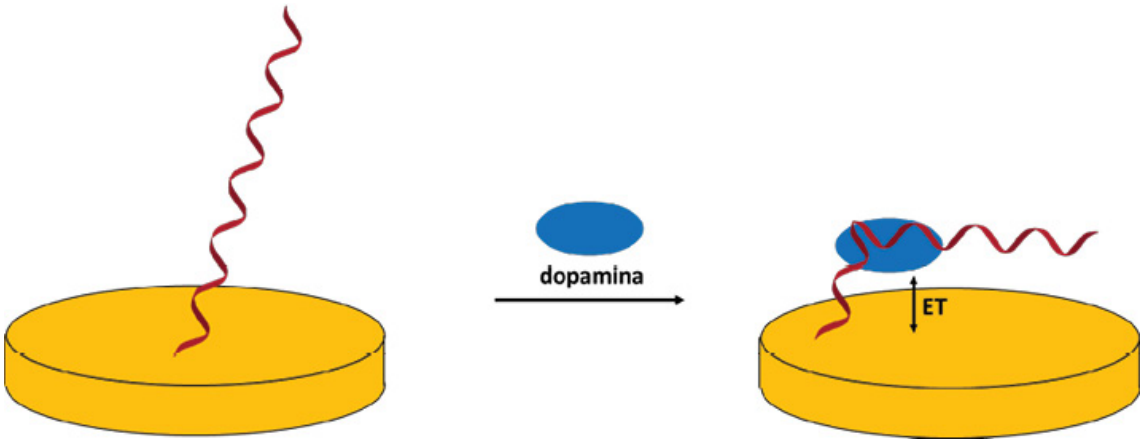
oddziaływania z białkiem doszło do powstania struktury trójdrożnej (*three-way junction*) (rys. 5.24) [122].



RYS. 5.24

Schematyczne przedstawienie zmiany konformacji aptameru zaimmobilizowanego na powierzchni złotej elektrody dyskowej na skutek oddziaływania z białkiem PDGF-BB

Możliwe jest również zastosowanie tzw. aptasensorów bezznacznikowych do wykrywania analitów wykazujących właściwości redoks. Przykładem jest biosensor, którego warstwę receptorową stanowiły 57-nukleotydowe aptamery RNA specyficzne na dopaminę (rys. 5.25). Sygnał analityczny stanowił prąd utlenienia dopaminy, co umożliwiło wykrycie tej katecholaminy w zakresie stężeń od 100 nM do 5 μM [123].



RYS. 5.25

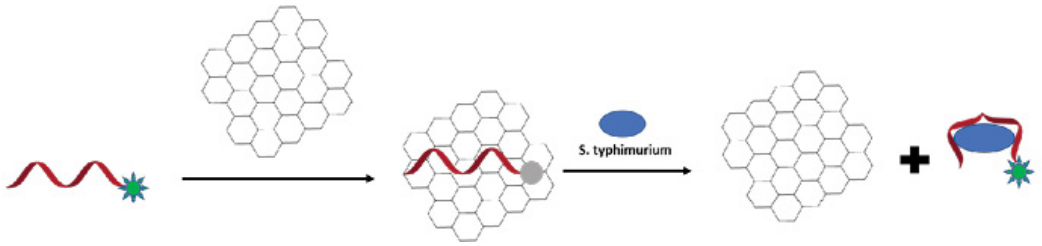
Schemat działania aptasensora do wykrycia dopaminy, w którym nie stosowano znacznika redoks

Choć elektrochemiczne aptasensory stanowią większą grupę biosensorów wykorzystujących sekwencje aptamerowe jako warstwę receptorową, istnieje szereg doniesień literaturowych, w których są stosowane inne techniki detekcji.

Kolejnym przykładem aptasensora jest układ do wykrywania ATP. Do utworzenia warstwy receptorowej zastosowano sekwencję DNA komplementarną (cDNA) do aptameru specyficznego na ATP. Powstała struktura dupleksu została wyznakowana kompleksem rutenu ($Ru(bpy)_2(cbpy)$) na końcu 3′ sekwencji cDNA, natomiast immobilizacja na złotej elektrodzie była możliwa dzięki obecności grupy tiolowej na końcu 5′ sekwencji komplementarnej. W obecności cząsteczek ATP doszło do odseparowania sekwencji aptamerowej od sekwencji komplementarnej i tworzenia kompleksu ATP–aptamer. To z kolei spowodowało utworzenie przez sekwencję odniesienia struktury spinki, co umożliwiło przybliżenie cząsteczek znacznika do powierzchni elektrody, dzięki czemu wzmocnieniu uległ sygnał elektroluminescencyjny [124].

Aptasensory mogą być również wykorzystane do wykrycia większych analitów i jednym z przykładów jest detekcja komórek *Salmonella typhimurium*. W tym celu zastosowano detekcję fluorymetryczną z użyciem platformy w postaci tlenku grafenu. Przy braku *S. typhimurium* doszło do adsorpcji cząsteczek aptamerów związanych z barwnikiem FAM, czemu towarzyszyło wygaszenie fluorescencji wywołane obecnością tlenku grafenu. Po wprowadzeniu cząsteczek analitu nastąpiło ich związanie z aptamerem, czego

efektem była zmiana jego konformacji i oderwanie od powierzchni tlenku grafenu. W konsekwencji zwiększeniu uległ sygnał fluorescencyjny [125].



RYS. 5.26
Schemat aptasensora do wykrywania komórek *Salmonella typhimurium*

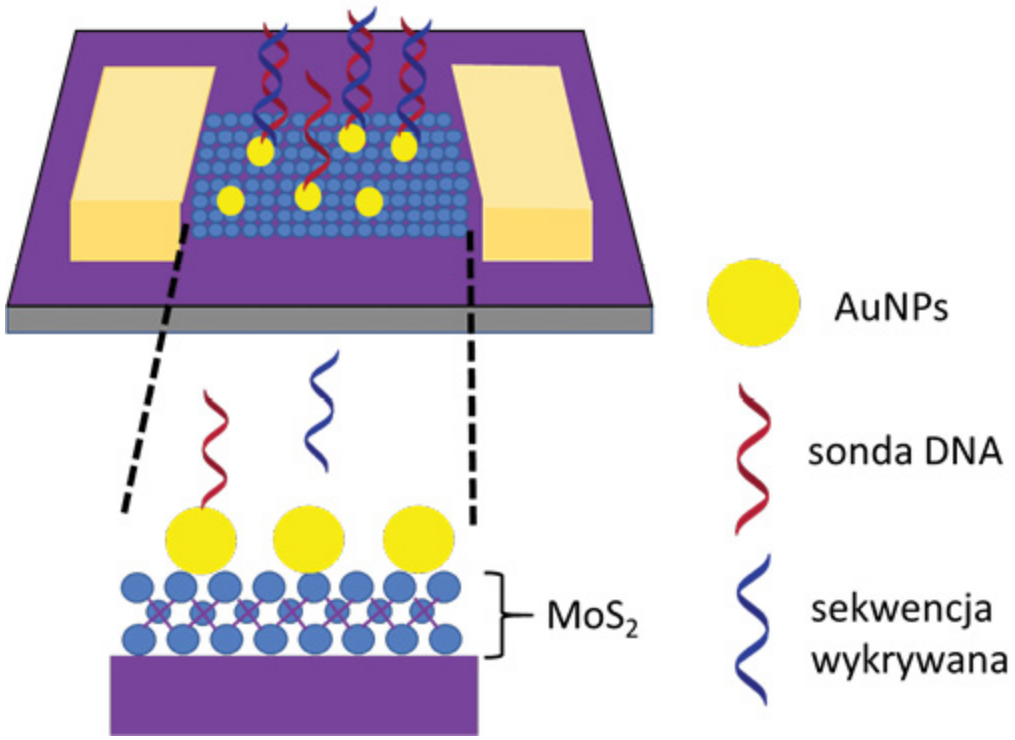
5.4.6
Przykłady biosensorów DNA

Należy pamiętać, że aptasensory nukleinowe są jedynie odmianą czujników DNA, w których w warstwie bioczułej rozpoznawany jest analit inny niż nić kwasu nukleinowego. Dlatego też zarówno w biosensorach DNA/RNA, jak i w aptasensorach stosuje się praktycznie takie same przetworniki, markery redoks, metody immobilizacji kwasów nukleinowych czy też mechanizmy detekcji. Można spotkać się również z przypadkami, w których zarówno aptasensor, jak i czujnik DNA/RNA docelowo jest wykorzystywany do wykrywania np. tego samego czynnika chorobotwórczego. W takim przypadku jednak oba te czujniki na poziomie molekularnym będą wykrywały bądź określony fragment nici kwasu nukleinowego warunkujący przynależność gatunkową danego patogenu, bądź wybrane białko produkowane wyłącznie przez dany patogen.

Niewątpliwą zaletą czujników dedykowanych wykrywaniu kwasów nukleinowych jest możliwość zwiększenia ilości wykrywanej sekwencji w próbce. Odbywa się to w trakcie wstępnego przygotowania próbki z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy, zarówno w klasycznych układach trójtemperaturowych, jak i w reakcjach izotermicznych.

Jak już wcześniej wspomniano, czujniki dedykowane wykrywaniu określonych sekwencji kwasów nukleinowych mogą być i są wykorzystywane w badaniach prenatalnych, analizie żywności genetycznie modyfikowanej czy też chociażby w szybkiej identyfikacji czynników chorobotwórczych. Jest to sytuacja zupełnie inna niż w przypadku aptasensorów, które z uwagi na dopiero rozwijającą się tą dziedzinę nauki nadal znajdują się w fazie badań.

Jeden z nowszych literaturowych przykładów elektrochemicznego czujnika DNA dedykowanego diagnostyce prenatalnej pod kątem identyfikacji zespołu Downa został zaprezentowany w 2019 roku przez Jingxia Liu, rys. 5.27[126].



RYS. 5.27

Schemat elektrochemicznego czujnika DNA w technologii FET dedykowanego diagnostyce prenatalnej [126]

Podłożem czujnika, na którym dochodziło do rozpoznania molekularnego, była cienka warstwa MoS_2 z naniesioną ściśle określoną ilością nanocząstek złota (AuNPs) o starannie dobranej średnicy. Na powierzchni nanocząstek unieruchomiono sekwencje kwasów nukleinowych, tzw. sondy, jako element bioczuły. Tak przygotowane podłoże umożliwiło wiarygodne wykrycie sekwencji DNA na poziomie 0,1 fM przy zachowaniu wysokiej selektywności w postaci rozróżnienia trzech mutacji punktowych. Takie parametry, jak twierdzą autorzy, umożliwiają z powodzeniem zastosowanie czujnika w prowadzeniu rutynowej diagnostyki [126].

Dość dużym obszarem badawczym związanym z zastosowaniem biosensorów DNA jest szybkie wykrywanie patogenów, zarówno

bakteryjnych, jak i wirusowych, odpowiedzialnych za konkretne zakażanie. Jest to o tyle istotne, że tego typu badania diagnostyczne, poprzez miniaturyzację oraz zastosowanie układów mikroprzepływowych, prowadzi się bezpośrednio w miejscu pobrania próbki. Skraca to czas niezbędny na podjęcie dalszych decyzji o np. zastosowaniu konkretnej terapii antybiotykowej czy też konieczności izolacji pacjenta. Ciekawym przykładem może być praca przedstawiona przez Yu-Dong Ma w 2019 roku [127]. Zaprezentował on całą platformę detekcyjną która obejmowała etapy od oczyszczania próbek (zawierających bakterie i/lub wirusy), ekstrakcję materiału genetycznego, jego amplifikację z wykorzystaniem izotermicznej reakcji amplifikacji oraz samego procesu detekcji z wykorzystaniem smartfonu. Aplikacja zainstalowana w telefonie komórkowym umożliwiała również sterowanie całym procesem detekcyjnym. Procedura diagnostyczna, od pobrania próbki do uzyskania wyniku, trwała jedynie 40 minut i była w pełni zautomatyzowana. Zaprezentowane rozwiązanie zostało wykorzystane do wykrycia wirusa grypy typu A (H1N1) oraz szczepu bakterii *Staphylococcus aureus* opornego na metycylinę. Zaprezentowane przez autorów w pełni automatyczne urządzenie pozwalało na wykrycie wirusa oraz bakterii na poziomie odpowiednio $3{,}2 \cdot 10^{-3}$ jednostki hemaglutynacji, HAU (*hemagglutinating unit*) oraz 30 jednostkom tworzących kolonię, CFU (*colony-forming unit*). Takie granice detekcji z powodzeniem spełniały standardy czułości badań klinicznych [127].

Liczba doniesień literaturowych dotyczących zastosowania kwasów nukleinowych jako warstw receptorowych stale się powiększa. Nadal pozostaje jednak otwarta kwestia dotycząca

poprawy ich stabilności pod kątem przechowywania gotowych biosensorów czy też regeneracji w celu ponownego wykorzystania. Trzeba również podkreślić, że znajomość natury oddziaływania aptamerowych warstw receptorowych złożonych z oligonukleotydów DNA lub RNA z analitami różnej klasy została zbadana dla ograniczonej liczby sekwencji. Poszerzenie wiedzy w tym zakresie, w tym rozwój metody SELEX, a także poprawa parametrów pracy tych biosensorów, w tym ich selektywności i stabilności, jest niezbędne, aby opracowane urządzenia stały się alternatywnym rozwiązaniem dla już istniejących technik analitycznych. Obecnie jest obserwowany dynamiczny rozwój biosensorów, technologii ich wytwarzania, jak i metod przetwarzania sygnału pochodzącego z warstwy bioreceptorowej, który jest związany z szeregiem zalet, jakie charakteryzują te urządzenia. Biosensor to niewielkie urządzenie, dlatego do analiz wykorzystywane są małe objętości próbek, co dramatycznie wpływa na ograniczenie kosztów. Redukowany jest również czas niezbędny na uzyskanie wyników. Ponadto możliwość dowolnego doboru warstwy bioreceptorowej umożliwia stosowanie biosensorów zarówno w badaniach diagnostycznych, przy oznaczaniu ważnych klinicznie analitów (np. glukoza), jak i do rozpoznawania chorób genetycznych, identyfikacji gatunkowej drobnoustrojów, w tym m.in. oznaczania bakterii patogennych w krwi pacjentów oddziałów szpitalnych (co jest szczególnie ważne w przypadku zakażeń szczepami wieloopornymi, gdzie szybka identyfikacja gatunkowa pozwala na możliwie szybki i trafny dobór kuracji antybiotykowej) oraz identyfikacji żywności genetycznie modyfikowanej (przepisy obowiązujące na terenie Unii Europejskiej). Już teraz jedną z możliwości jest opracowanie tzw.

mikromacierzy DNA oraz chipów DNA, które umożliwiają analizę ekspresji genów oraz wykrywanie obecności mutacji punktowej w badanych próbkach. W przypadku mikromacierzy dochodzi do utworzenia kilku tysięcy miejsc testowych na bardzo małej powierzchni, gdzie dochodzi do zaimmobilizowania kowalencyjnego bądź niekowalencyjnego fragmentów kwasów nukleinowych, czyli tzw. sond. Uzyskany układ służy detekcji sekwencji DNA lub RNA, gdzie wykorzystywanym mechanizmem jest zajście procesu hybrydyzacji, które może być wykryte dzięki zastosowaniu sond reporterowych i użyciu odpowiednich znaczników wykorzystujących zjawisko fluorescencji, chemiluminescencji, detekcję kolorymetryczną oraz cząsteczki radioizotopów. Testy te znalazły swoje zastosowanie w wykrywaniu chorób zakaźnych, genetycznych i nowotworowych, a także w kryminalistyce [128]. Z pewnością kolejne lata przyniosą nowe, liczne przykłady zastosowania kwasów nukleinowych w postaci warstw receptorowych, które mogłyby znaleźć zastosowanie w analizie klinicznej i środowiskowej.

5.5
Biosensory mikrobiologiczne

Łukasz GÓRSKI

Sensory mikrobiologiczne powstają w wyniku unieruchomienia mikroorganizmów na powierzchni przetwornika. Grupa ta jest zaliczana, podobnie jak sensory enzymatyczne, do sensorów

katalitycznych. W istocie jako element aktywny warstwy biologicznej są wykorzystywane układy enzymatyczne obecne w komórkach stosowanych mikroorganizmów. Analit wpływa w pewien sposób na aktywność metaboliczną mikroorganizmu, a rolą przetwornika jest zmierzenie tej zmiany.

Stosowanie jako elementu biologicznego mikroorganizmów ma pewne zalety w porównaniu do wykorzystywania izolowanych enzymów. Kosztowny proces wydzielania i oczyszczania enzymu (enzymy są często bardzo drogie) jest eliminowany, a enzym jest utrzymywany w swoim naturalnym środowisku, dzięki czemu może zostać wydłużony okres jego aktywności.

Niestety, sensory mikrobiologiczne mają też liczne wady. Należy tu wymienić przede wszystkim konieczność utrzymywania mikroorganizmów przy życiu, co wymaga odpowiedniego sposobu ich immobilizacji oraz przechowywania gotowego sensora w pożywce. W okresie użytkowania urządzenia, mikroorganizmy rozmnażają się, co powoduje niestabilność parametrów analitycznych w czasie. Ponadto drobnoustroje mogą ulegać spontanicznym mutacjom, co jeszcze w większym stopniu zmienia ich funkcjonowanie. Komórki zawierają ogromną liczbę enzymów, które mogą być katalizatorami wielu przemian. Trudno więc uzyskać tak dobrą selektywność z zastosowaniem sensorów mikrobiologicznych, jak w przypadku wykorzystania enzymów. Problemem jest też często długi czas odpowiedzi sensora, który wynika z wieloetapowego sposobu powstawania sygnału analitycznego: analit musi dostać się do komórki przez błonę komórkową, następnie jest włączany w proces metaboliczny, często też konieczne jest wydostanie się produktu przemian metabolicznych

z komórki, po czym możliwe jest dopiero jego rozpoznanie przez przetwornik. Liczne wady sensorów mikrobiologicznych sprawiają, że nie są one bardzo powszechne, a ich zastosowanie jest ograniczone do specyficznych próbek i analitów [129–133].

5.5.1 Mikroorganizmy stosowane w sensorach

Mikroorganizmy to pojęcie niezbyt precyzyjne, a odnosi się zazwyczaj do wszystkich organizmów jednokomórkowych. Wśród nich można wyróżnić: bakterie, archeony, protisty oraz grzyby mikroskopijne. Protisty i grzyby należą do eukariontów, charakteryzujących się wydzielonym jądrem komórkowym. Bakterie i archeony należą do prokariontów, które są definiowane jako organizmy niemające wydzielonego jądra komórkowego. Zdecydowana większość sensorów mikrobiologicznych wykorzystuje do swojego działania bakterie.

Mikroorganizmy mogą być również podzielone na trzy typy, w zależności od zapotrzebowania na tlen. Grupy te to: tlenowce (aeroby), beztlenowce względne (anaeroby fakultatywne) oraz beztlenowce bezwzględne (anaeroby obligatoryjne). Tlenowce wymagają obecności tlenu do wzrostu, a dzięki oddychaniu tlenowemu mogą one skutecznie pozyskiwać energię ze związków organicznych obecnych w środowisku. Jest to ważna grupa mikroorganizmów w przypadku biosensorów, ponieważ ich aktywność metaboliczna może być kontrolowana poprzez pomiar

zużycia tlenu. W przypadku stosowania mikroorganizmów beztlenowych w konstrukcji biosensora, konieczne jest wykorzystanie innego sposobu pomiaru ich aktywności metabolicznej.

5.5.2 Immobilizacja mikroorganizmów na przetwornikach

Immobilizacja mikroorganizmów na przetworniku to kluczowy etap przygotowania biosensora, od którego w znacznym stopniu zależą parametry analityczne urządzenia. Czynniki, które są istotne w wyborze sposobu immobilizacji mikroorganizmów, obejmują:

1) typ mikroorganizmu podlegający immobilizacji;
2) rodzaj podłoża, z którego jest wykonany przetwornik;
3) wymagania dotyczące żywotności i możliwości rozmnażania się mikroorganizmu;
4) docelowe zastosowanie biosensora.

Aby w rezultacie immobilizacji nie nastąpiło obniżenie żywotności mikroorganizmów, często wykorzystuje się łagodne metody unieruchamiania, takie jak adsorpcja fizyczna, pułapkowanie w matrycy czy też enkapsulacja. Szczególnym rodzajem adsorpcji mikroorganizmów jest tworzenie przez nie na powierzchni biofilmu – warstwy komórek otoczonych produkowanymi przez nie substancjami organicznymi i nieorganicznymi. Zaletą tego sposobu immobilizacji jest wysoka żywotność mikroorganizmów w biofilmie

oraz ich bezpośredni kontakt z przetwornikiem, co podnosi czułość, szczególnie w przypadku sensorów elektrochemicznych.

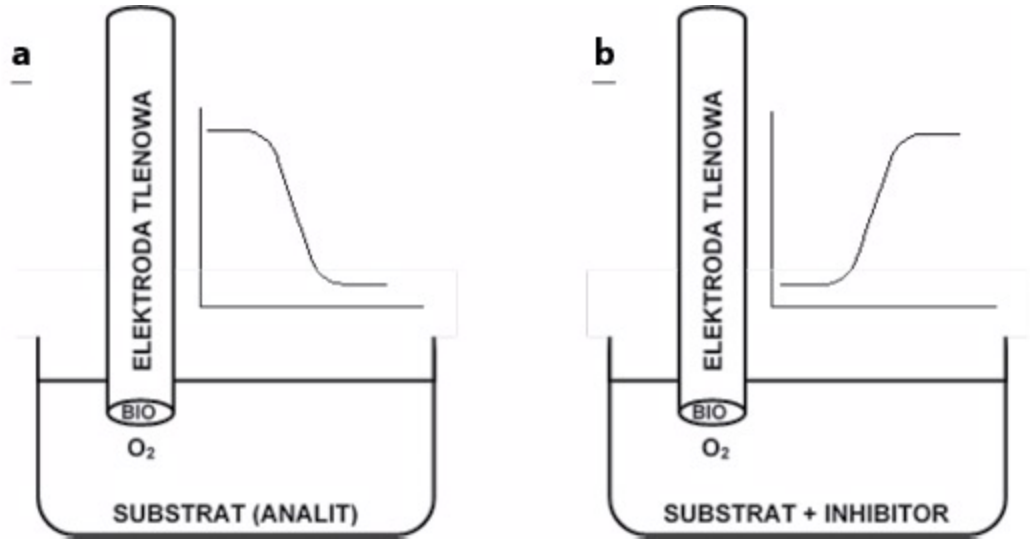
Pułapkowanie w hydrożelu jest również często stosowaną metodą immobilizacji drobnoustrojów. Niektóre z najczęściej używanych matryc to alginian wapnia, agaroza i chitozan. Oprócz skutecznego utrzymywania żywotności, matryce te tworzą trójwymiarową strukturę, ułatwiającą wzrost i proliferację komórek. Pewną wadą takiego rozwiązania, szczególnie z punktu widzenia wykorzystania technik elektrochemicznych, jest znaczna grubość warstwy receptorowej i jej izolujący charakter. Dlatego też są prowadzone prace nad wprowadzeniem do tego rodzaju matryc dodatku nanomateriałów (grafenu, nanokropek węglowych, nanocząstek metali) zwiększających przewodnictwo.

Immobilizacja mikroorganizmów z wykorzystaniem wiązań kowalencyjnych zapewnia trwałą i stabilną warstwę receptorową. Najczęściej stosuje się dowiązywanie w wykorzystaniem aldehydu glutarowego, jednak spotykane są także inne rozwiązania, np. zastosowanie przeciwciał.

5.5.3
Układy pomiarowe

Najczęściej spotykanym rodzajem biosensorów mikrobiologicznych są urządzenia wykorzystujące pomiar spadku stężenia tlenu rozpuszczonego w próbce (rys. 5.28) [134]. Spadek ten wynika z aktywności mikroorganizmów metabolizujących analit, może więc być skorelowany ze stężeniem oznaczanej substancji. Większy

spadek stężenia tlenu oznacza wyższe stężenie analitu w próbce. Możliwe jest także oznaczanie substancji inhibitujących rozwój mikroorganizmów. W tym przypadku w próbce jest utrzymywane stałe stężenie substancji stanowiących pożywkę dla mikroorganizmów, dlatego też zużycie tlenu jest na stałym poziomie. Po wprowadzeniu do próbki substancji toksycznej dla mikroorganizmów, ich aktywność metaboliczna spada, co skutkuje spadkiem zużycia tlenu proporcjonalnym do stężenia toksyny.



RYS. 5.28

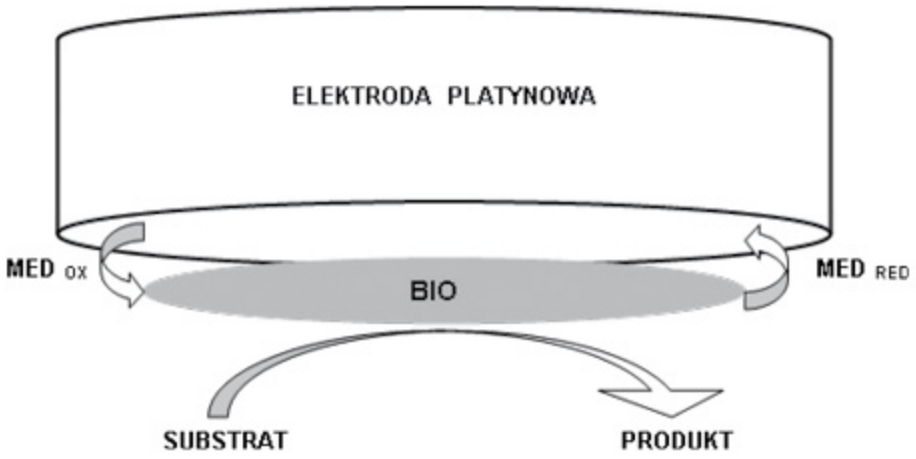
Mechanizmy działania biosensorów mikrobiologicznych z elektrodą tlenową jako przetwornikiem: a) analit będący substratem dla mikroorganizmów, przy wzroście stężenia analitu obserwowany spadek stężenia tlenu; b) analit powodujący spadek aktywności metabolicznej mikroorganizmów, przy wzroście stężenia analitu obserwowany wzrost stężenia tlenu. Przedstawiono również charakter zmiany sygnału analitycznego w czasie pomiaru

Najpopularniejszym urządzeniem do pomiaru stężenia rozpuszczonego tlenu jest elektroda Clarka. Jest ona zazwyczaj konstruowana jako układ dwu elektrod: pracującej elektrody

platynowej oraz chlorosrebrowej elektrody odniesienia. Obydwie elektrody są zanurzone w roztworze elektrolitu (zazwyczaj KCl) oddzielonego od próbki membraną przepuszczalną dla gazów. Na elektrodzie pracującej zachodzi redukcja tlenu dyfundującego z próbki do elektrolitu wewnętrznego poprzez membranę, a prąd generowany dzięki tej reakcji stanowi sygnał analityczny. Potencjał elektrody pracującej jest utrzymywany na stałym poziomie wobec elektrody chlorosrebrowej stanowiącej elektrodę odniesienia, pomiar ma więc charakter amperometryczny.

Zamiast elektrochemicznego pomiaru stężenia tlenu, możliwe jest wykorzystanie mediatorów redoks wprowadzonych do próbki w celu monitorowania aktywności oddechowej mikroorganizmów. Urządzenia takie działają analogicznie do popularnych biosensorów enzymatycznych drugiej generacji. Najczęściej jako mediatory stosowane są jony heksacyjanożelazianowe(III). Podczas utleniania substancji stanowiących pożywkę mikroorganizmów, mediator ten pełni funkcję akceptora elektronów i ulega redukcji do heksacyjanożelazianu(II). Stężenie tego związku może być oznaczone amperometrycznie, a wartość mierzonego prądu jest proporcjonalna do stężenia oznaczanej substancji. W porównaniu do sensorów wykorzystujących bezpośredni pomiar zużycia tlenu, układy wykorzystujące mediatory mają liczne zalety. Ważna jest możliwość zastosowania mediatora o rozpuszczalności w wodzie większej niż rozpuszczalność tlenu, dzięki czemu można uzyskać wyższy sygnał prądowy. Układ pomiarowy jest prostszy, nie wymaga bowiem natleniania próbki przed pomiarem. Z uwagi na niższe wartości potencjału przykładanego do elektrody pracującej,

w porównaniu do oznaczania tlenu, poprawie ulega selektywność pomiaru.

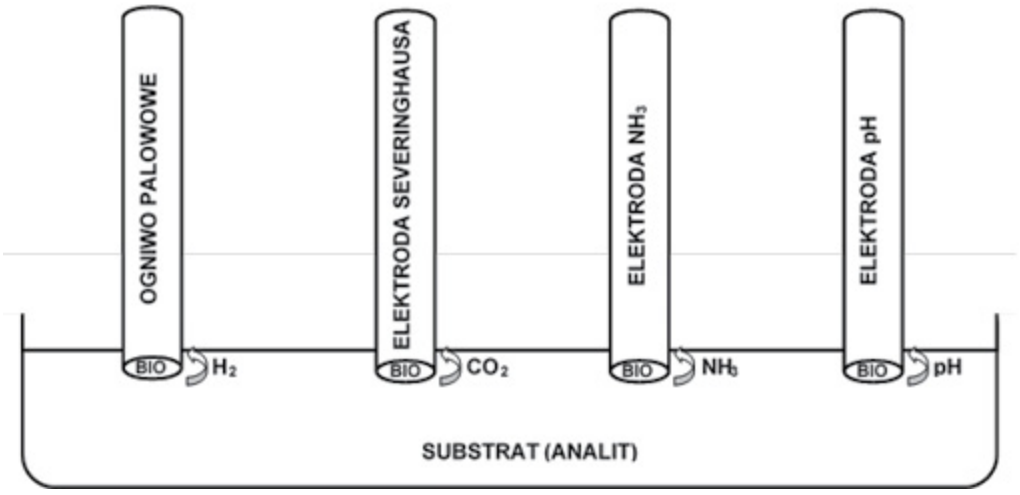


RYS. 5.29

Mechanizm działania biosensora mikrobiologicznego wykorzystującego mediator (MED) w formie utlenionej (OX) i zredukowanej (RED) do przeniesienia sygnału między warstwą receptorową zawierającą mikroorganizmy (BIO) a elektrodą

Oprócz pomiaru zużycia tlenu, aktywność metaboliczna mikroorganizmów unieruchomionych w warstwie receptorowej biosensora może być także monitorowana poprzez pomiar ilości wydzielanych metabolitów. Najczęściej wykorzystuje się elektrochemiczne monitorowanie prostych substancji, takich jak wodór (pomiar z zastosowaniem ogniwa paliwowego), CO_2 (pomiar z zastosowaniem elektrody Severinghausa), amoniak (pomiar z wykorzystaniem elektrody selektywnej na jony amonowe lub elektrody gazowej) lub zmiana pH (pomiar z wykorzystaniem elektrod jonoselektywnych lub tranzystorów polowych). W tego typu biosensorach jest możliwe zastosowanie wszystkich rodzajów

mikroorganizmów, w tym beztlenowców, co nie jest możliwe w przypadku pomiarów zużycia tlenu.



RYS. 5.30

Różne sposoby pomiaru metabolitów mikroorganizmów, wykorzystywane w konstrukcji biosensorów

Choć techniki elektrochemiczne zdecydowanie dominują w badaniach dotyczących biosensorów mikrobiologicznych, bywają stosowane także inne sposoby wytwarzania sygnału analitycznego. Najczęściej spotykana jest detekcja optyczna. Zaimmobilizowanie fotobakterii na odpowiednim detektorze (fotopowielaczu lub fotodiodzie) pozwala na pomiar bioluminescencji, której wielkość zależy od aktywności metabolicznej bakterii, a pośrednio od stężenia analitu. Możliwe jest oznaczanie zarówno substancji będących pożywką dla mikroorganizmów (wzrost intensywności bioluminescencji), jak i substancji toksycznych (spadek bioluminescencji). Coraz popularniejszą grupą mikroorganizmów stosowanych w biosensorach są organizmy modyfikowane genetycznie. Szczególnie ciekawym przykładem są bakterie

modyfikowane tak, aby wykazywały fluorescencję. Często w tym celu jest wykorzystywany gen kodujący wytwarzanie białka zielonej fluorescencji, charakteryzującego się emisją promieniowania przy długości fali 509 nm. Białko to, pochodzące z gatunku morskiej meduzy, jest obiektem szeroko zakrojonych badań, a jego odkrywcy uzyskali w 2008 roku Nagrodę Nobla z chemii. Inną możliwością jest wprowadzenie do mikroorganizmu genu kodującego lucyferazę. Jest to grupa enzymów z klasy oksydoreduktaz, katalizująca utlenianie lucyferyn – związków barwnych zdolnych do emitowania światła. Podobnie jak w przypadku białka zielonej fluorescencji, gen kodujący lucyferazę wprowadzono do wielu organizmów, w tym do mikroorganizmów używanych w biosensorach. Należy jednak zwrócić uwagę na różnicę w sposobie powstawania promieniowania w obu przypadkach: białko zielonej fluorescencji emituje promieniowanie po naświetleniu ze źródła zewnętrznego, mamy więc tu do czynienia z fluorescencją. Natomiast do działania lucyferazy konieczna jest obecność odpowiedniego substratu – lucyferyny, która emituje światło wskutek reakcji utleniania, co określamy jako bioluminescencję.

5.5.4
Zastosowania biosensorów mikrobiologicznych

Biosensory mikrobiologiczne znajdują zastosowanie we wszystkich dziedzinach chemii analitycznej, w tym w analizie przemysłowej,

klinicznej oraz środowiskowej. Ostatnie z wymienionych zastosowanie jest jednak zdecydowanie najszersze.

Analiza przemysłowa

W analizie przemysłowej sensory mikrobiologiczne są najczęściej wykorzystywane do kontroli procesów fermentacji [135–139]. Biosensory z zaimmobilizowanymi bakteriami lub drożdżami są wykorzystywane do oznaczania metanolu i etanolu w przemyśle spożywczym oraz przy produkcji paliw [140–143]. Przemysłowe procesy fermentacji wymagają również często monitorowania stężenia kwasów organicznych, co jest możliwe dzięki zastosowaniu biosensorów mikrobiologicznych, wykorzystujących najczęściej ogniwa paliwowe jako przetworniki [144, 145]. W przemyśle spożywczym ważna jest także możliwość oznaczania cukrów. Opracowano biosensory mikrobiologiczne przeznaczone zarówno do selektywnego oznaczania glukozy, jak i do analizy całkowitej ilości przyswajalnych cukrów, przy zastosowaniu elektrody tlenowej jako przetwornika [146, 147].

Analiza kliniczna

Zastosowanie biosensorów mikrobiologicznych w analizie klinicznej nie jest zbyt powszechne. Z uwagi na możliwość zakażenia, wykluczone jest ich stosowanie jako sensorów wszczepialnych bądź w inny sposób mających kontakt z pacjentem. Dlatego też urządzenia te są najczęściej wykorzystywane do wykrywania

niektórych chorób poprzez oznaczanie markerów w próbkach pobranych od pacjentów. Zaproponowano sensor przeznaczony do oznaczania fenyloalaniny, co może być pomocne w diagnostyce fenyloketonurii [148]. Jako przetwornik wykorzystano enzymatyczny sensor mleczanów skonstruowany na bazie elektrody tlenowej. Ciekawym rozwiązaniem jest też amperometryczny sensor przeznaczony do oznaczania paracetamolu – popularnego leku przeciwbólowego [149]. Zaimmobilizowany na elektrodzie złotej modyfikowanej polianiliną i nanorurkami węglowymi szczep *Bacillus subtilis* pozwolił na utlenienie paracetamolu do odpowiedniego chinonu, który był oznaczany elektrochemicznie. Najważniejszym zastosowaniem biosensorów mikrobiologicznych w analizie klinicznej są badania antybiotyków. Pierwsze tego typu sensory służyły do oznaczania stężenia antybiotyku, czego przykładem może być urządzenie do analizy antybiotyków przeciwgrzybiczych [150]. Dzięki zastosowaniu drożdży w warstwie receptorowej, możliwe było oznaczanie nystatyny. Obecnie sensory mikrobiologiczne służą do szeroko zakrojonych badań podatności mikroorganizmów na leki. Przykładem może tu być praca, w której badano podatność różnych szczepów *Mycobacterium tuberculosis* na szereg antybiotyków [151]. Bakterie były immobilizowane na elektrodzie tlenowej, mierzącej zużywanie przez nie tlenu podczas utleniania gliceryny. Główną zaletą badanego układu jest przyspieszenie procedury oceny działania antybiotyków na prątki gruźlicy w porównaniu z tradycyjnymi technikami.

Analiza środowiskowa

Zdecydowanie najszerszym obszarem zastosowań biosensorów mikrobiologicznych jest analiza środowiskowa. Sensory te bywają stosowane do oznaczania konkretnych zanieczyszczeń obecnych w próbkach środowiskowych, częściej jednak są używane do oznaczania bardziej ogólnych parametrów, takich jak obecność związków toksycznych lub organicznych.

Biochemiczne zapotrzebowanie tlenu (BZT) to ogólny parametr mówiący o ilości w próbce związków organicznych, które mogą być utlenione przez bakterie tlenowe. Jest to więc miara czystości wody lub skuteczności oczyszczania ścieków. Najczęściej stosowana do oznaczania BZT jest metoda manometryczna, polegająca na pomiarze zużycia tlenu w roztworze zawierającym badaną próbkę i mikroorganizmy w czasie kilkudniowej inkubacji. Do oceny zużycia tlenu wykorzystuje się pomiar spadku ciśnienia w naczyniu, przy czym powstający CO_2 musi być absorbowany. Metoda ta jest dość prosta, jednak jej istotną wadą jest długi czas oczekiwania na wynik, wynoszący co najmniej 5 dni. Dlatego też opracowano szereg sensorów mikrobiologicznych mających znacząco skrócić czas potrzebny do pomiaru BZT. Istotnym zagadnieniem przy projektowaniu biosensorów BZT jest rodzaj wykorzystywanych mikroorganizmów. Często stosuje się konsorcjum mikroorganizmów, pochodzących z gleby lub z osadu czynnego [152]. Zaletą takiego rozwiązania jest szersza grupa związków, które ulegają utlenieniu przez bakterie, dzięki czemu zmierzona wartość BZT jest bliższa wynikowi otrzymanemu metodą klasyczną. Wadą takiego rozwiązania jest jednak brak powtarzalności, ponieważ nie mamy

kontroli nad składem konsorcjum mikroorganizmów, ponadto skład ten może się zmieniać w czasie. Problemy takie nie występują w przypadku stosowania konkretnego szczepu bakterii, jednak takie rozwiązania wykazują zazwyczaj niższe niż rzeczywiste wartości BZT, z uwagi na pewną selektywność bakterii odnośnie do metabolizowanych substancji organicznych obecnych w próbce [153].

Najpopularniejszym przetwornikiem w przypadku mikrobiologicznych sensorów BZT jest elektroda Clarka, mierząca zużycie tlenu przez mikroorganizmy. Taki sposób pomiaru w najlepszy sposób odwzorowuje metodę klasyczną, jest też stosunkowo prosty [154–156]. Z zastosowaniem tego typu sensorów, czas oznaczenia może być zdecydowanie skrócony, często do kilku minut [154]. Pewnym utrudnieniem w niektórych przypadkach jest konieczność natleniania próbki. Znaczącą wadą mikrobiologicznych sensorów BZT jest ograniczona zdolność do pomiaru niskich wartości tego parametru, często wynikająca z obecności niewielkich stężeń związków trudnych do utlenienia [157, 158]. Krótki czas pomiaru z zastosowaniem sensorów utrudnia utlenienie tych związków przez mikroorganizmy w warstwie receptorowej, dlatego podjęto próby wstępnego przygotowania próbki i rozkładu tych związków przez wykorzystanie ozonowania lub reakcji fotokatalitycznych [155, 156].

W ostatnich latach coraz więcej badań dotyczy mikrobiologicznych sensorów BZT wykorzystujących mediatory [159, 160]. Stężenie tlenu w próbce nie ma wpływu na wyniki otrzymywane z wykorzystaniem tego typu urządzeń, dzięki czemu wykazują one dużą zgodność z wartościami BZT mierzonymi metodą

klasyczną. Badaniami objęto także sensory wykorzystujące układ dwu mediatorów redoks [161, 162].

Pierwsze opracowane mikrobiologiczne sensory BZT wykorzystywały ogniwa paliwowe jako przetworniki [163]. Prąd powstający w wyniku utleniania związków organicznych przez zaimmobilizowane na elektrodzie bakterie może być skorelowany z wartością BZT próbki zanieczyszczonej wody. Tego typu układy charakteryzują się wysoką stabilnością parametrów pracy i mogą być wykorzystywane do monitorowania stopnia zanieczyszczenia wody. Nie wymagają także zewnętrznego źródła zasilania, dzięki czemu mogą być wykorzystywane do pomiarów w terenie [164, 165].

Ważnym zastosowaniem sensorów mikrobiologicznych w analizie środowiskowej jest oznaczanie substancji toksycznych, a w szczególności pomiar ogólnej toksyczności próbki. Oznaczanie konkretnych związków chemicznych z wykorzystaniem klasycznych metod chemii analitycznej nie może dostarczyć informacji na temat ich toksyczności. Konieczne jest wykorzystanie w tym celu organizmów, m.in. mięczaków, ryb, a nawet ptaków. Znacznie prostszym, tańszym oraz bardziej etycznym rozwiązaniem jest wykorzystanie w tym celu sensorów mikrobiologicznych. Szczególnie często w tego typu sensorach wykorzystywane są bakterie luminescencyjne [166, 167]. Obecność w próbce substancji toksycznych powoduje ograniczenie aktywności metabolicznej bakterii, co wiąże się ze zmniejszeniem emisji światła. Podjęto także próby wytworzenia sensorów przeznaczonych do oznaczania konkretnych substancji toksycznych, np. cyjanków lub metali ciężkich [168–171]. Problemem w tym przypadku jest ograniczona selektywność, ponieważ inne substancje toksyczne dla

mikroorganizmów (np. pestycydy) obecne w próbce również wpływają na ich mierzoną żywotność.

5.6
Biosensory enzymatyczne

Urszula WAWRZYNIAK

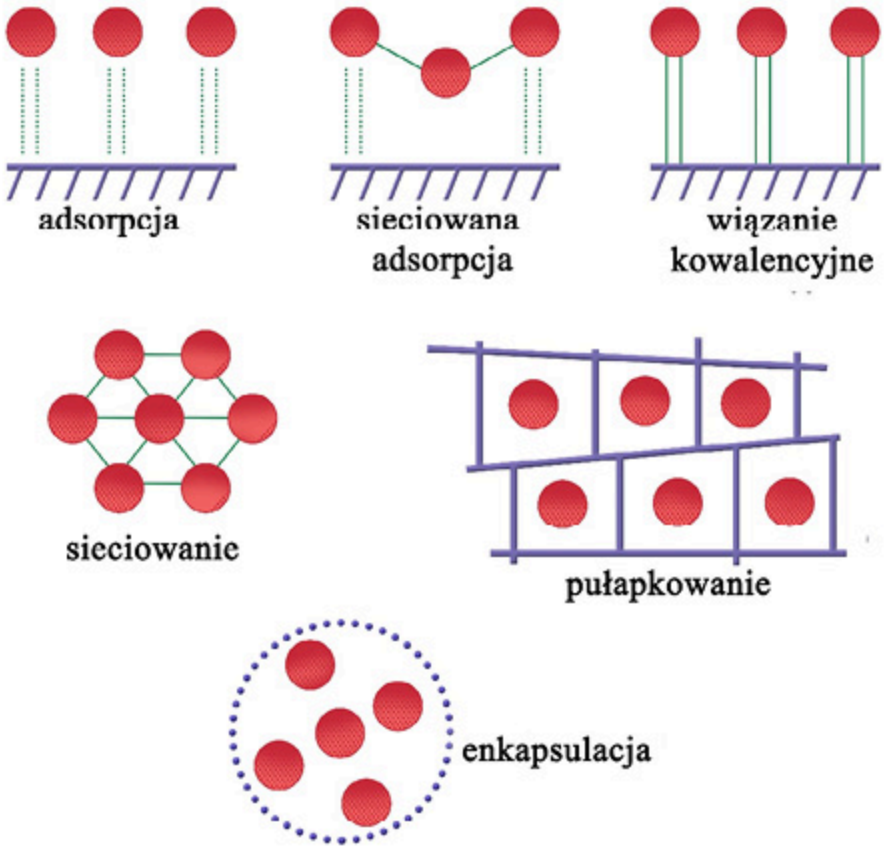
Enzymy stanowią jeden z najczęściej wykorzystywanych elementów biologicznych w sensorach chemicznych. Niemal wszystkie enzymy są prostymi lub złożonymi białkami, niezbędnymi do zachodzenia ważnych procesów życiowych i prawidłowego funkcjonowania organizmów. Ich wyjątkowa rola w przyrodzie wynika z właściwości katalitycznych, dzięki którym możliwe jest obniżenie bariery energii aktywacji cząsteczek, czyli minimalnej energii koniecznej do przebiegu określonej reakcji chemicznej i przeprowadzenia cząsteczek w tzw. stan aktywny, co warunkuje wytworzenie lub rozerwanie wiązania chemicznego. W konsekwencji szybkość reakcji chemicznej zwiększa się nawet do 10^8–10^{10} razy. Niesamowita katalityczna skuteczność enzymów sprawia, że skomplikowane przemiany chemiczne w organizmie mogą zachodzić w umiarkowanych czy też łagodnych warunkach (niska temperatura, niewysokie ciśnienie) w porównaniu do tych, jakie trzeba stosować w procesach przemysłowych. Enzymy umożliwiają rozpoczęcie danej reakcji, a działając jako regulatory, zapewniają jej prawidłowy przebieg. Charakteryzują się wysoką selektywnością względem

substratu oraz specyficznością wobec katalizowanej reakcji (specyficzność geometryczna, stereospecyficzność) – katalizują tylko określone reakcje biochemiczne z udziałem odpowiednich substratów. Enzymy działają jedynie w środowisku wodnym a ich złożona budowa sprawia, że wykazują aktywność katalityczną wyłącznie w konkretnym miejscu naszego organizmu, w danych warunkach temperatury i przy zachowaniu określonego pH środowiska reakcji. Ponadto łączą w sobie zdolność rozpoznania substratu (rozpoznają tylko określone cząsteczki chemiczne spośród wielu obecnych wewnątrz organizmu) i wzmocnienia sygnału analitycznego, co jest niezwykle istotne przy projektowaniu sensorów enzymatycznych. Ważnym zadaniem konstrukcyjnym jest również dobór odpowiedniej matrycy, która umożliwi skuteczne unieruchomienie białka, a tym samym zapewni jak najlepszy jego kontakt z powierzchnią elektrody.

Metody immobilizacji enzymów w biosensorach

Bardzo ważnym wyzwaniem w konstrukcji biosensorów enzymatycznych jest efektywna immobilizacja enzymu na przetworniku, zapewniająca zachowanie jego aktywności biologicznej i długiego czasu życia. Białka wykazują aktywność katalityczną od kilku godzin do dwóch dni, ale ich czas działania można wydłużyć poprzez unieruchomienie na nośniku, warunkujące właściwą orientację względem jego powierzchni, optymalną do wzajemnego oddziaływania między enzymem a elektrodą [172].

Dobór optymalnej metody immobilizacji jest trudnym zadaniem konstrukcyjnym podczas projektowania biosensora. Zależy od kilku czynników (typ unieruchamianego enzymu oraz rodzaj katalizowanej przez niego reakcji) i jest podyktowany przede wszystkim jego zastosowaniami [173]. Przedstawiony schematycznie na rys. 5.31 podział metod immobilizacji enzymów obejmuje metody zarówno fizyczne (adsorpcję, pułapkowanie, enkapsulację), jak i chemiczne (wiązanie kowalencyjne, sieciowanie) [174]. Klasyfikacji można również dokonać, biorąc jako kryterium to, czy biocząsteczki są osadzane bezpośrednio na powierzchni przetwornika (fizyczna adsorpcja, chemiczne wiązanie kowalencyjne), czy też zostają unieruchomione w specjalnej matrycy (fizyczne pułapkowanie, enkapsulacja, chemiczne sieciowanie).



RYS. 5.31

Metody immobilizacji enzymów w biosensorach

Najstarszym i najprostszym sposobem zakotwiczenia enzymu na nośniku jest **adsorpcja fizyczna**. Wzajemne oddziaływania enzymu z podłożem (matrycą) zachodzą poprzez wiązania jonowe, wodorowe, hydrofobowe oraz siły van der Waalsa [175]. Roztwór enzymu, zawiesina komórek, czy też fragment tkanki nanosi się na przetwornik, przy zachowaniu odpowiednich warunków (temperatura, pH, siła jonowa). Przetwornik z zaadsorbowaną warstwą białka jest następnie pokrywany membraną przepuszczalną dla analitu. Jako przykład immobilizacji enzymu poprzez adsorpcję

można podać unieruchomienie aminoacylazy u na nośniku DEAE – Sephadex, co wykorzystuje się do produkcji aminokwasów na skalę przemysłową [176]. Immobilizacja białka na drodze adsorpcji jest prostym procesem fizycznym zachodzącym w łagodnych warunkach, wiąże się z niewielkimi kosztami i wymaganiami technologicznymi. Zaletą tej metody jest możliwość wykorzystywania różnorodnych podłoży. Immobilizacja enzymu poprzez adsorpcję pozwala również zachować niezmienioną strukturę biokatalizatora, ale duży problem stanowi jednak podatność biokatalizatora na wymywanie, co związane jest z jego słabym oddziaływaniem z nośnikiem.

Wśród metod fizycznych immobilizacji enzymów oprócz adsorpcji można wyróżnić pułapkowanie w sieci żelu, w emulsjach, zamykanie w makro- i mikrokapsułkach, w membranie do dializy oraz otoczkowanie. Immobilizacja białka poprzez **pułapkowanie** oznacza jego inkluzję wewnątrz struktur naturalnych lub syntetycznych. Najczęściej realizuje się to poprzez polimeryzację nośnika w obecności enzymu, prowadzącą do zamknięcia enzymu w porach żelu. Pułapkowanie wiąże się z możliwością stosowania białka o niskim stopniu czystości, co zdecydowanie ogranicza koszty takiej immobilizacji i koszty związane z konstrukcją sensora. Niestety metoda ta nie może być wykorzystywana powszechnie do wielu enzymów z uwagi na ograniczenia wynikające z dyfundowania substratów oraz produktów do i ze struktury polimeru oraz degradację polimerów przez enzymy hydrolityczne [177]. Techniką immobilizacji enzymów zbliżoną do pułapkowania jest **kapsułkowanie**, in. **enkapsulacja**, polegająca na zamknięciu enzymu w sferycznej kapsule utworzonej z półprzepuszczalnej membrany (np. membrany wykonanej z nylonu lub domieszkowanej

azotanem(V) celulozy). Unieruchomiony enzym stanowi rdzeń otrzymanej kapsułki, natomiast materiał ścianek umożliwia transport małocząsteczkowych reagentów. W ten sposób powstaje naturalna warstwa, która chroni enzym przed niekorzystnym wpływem środowiska reakcji, jednocześnie umożliwiając zachodzenie reakcji katalitycznej. Enkapsulacja pozwala zachować aktywność enzymu przez odpowiednio długi czas, co jest niewątpliwie zaletą przy konstrukcji biosensorów. Enkapsulację z powodzeniem stosuje się w przemyśle kosmetycznym. Jednakże skomplikowana procedura wykonania i związane z tym wysokie koszty sprawiają, że kapsułkowanie nie jest szeroko stosowane w procesach przemysłowych [178].

Metody chemiczne immobilizacji enzymów polegają na bezpośrednim połączeniu białka z matrycą poprzez **wytworzenie wiązania kowalencyjnego** (związanie kowalencyjne z matrycą żelową lub bezpośrednie związanie kowalencyjne z powierzchnią przetwornika w przypadku sensorów elektrochemicznych). Zapewnia to wysoką stabilność otrzymanego układu osiąganą dzięki trwałemu unieruchomieniu biokatalizatora w warstwie receptorowej sensora. Utworzenie wiązania kowalencyjnego wymaga jednak obecności na powierzchni nośnika odpowiednich grup funkcyjnych (np. karboksylowych, hydroksylowych) oraz wolnych grup aminowych, karboksylowych lub tiolowych w enzymach. Wiązanie chemiczne pomiędzy nośnikiem i immobilizowanym białkiem zazwyczaj nie powstaje spontanicznie – reakcja zachodzi pomiędzy odpowiednimi końcowymi grupami funkcyjnymi enzymu (nieistotnymi dla jego katalitycznej aktywności) i reaktywnymi grupami dostępnymi na powierzchni przetwornika. Wykorzystywane są głównie grupy

funkcyjne znajdujące się w łańcuchach bocznych aminokwasów w enzymach, w tym grupa karboksylowa asparaginy i glutaminy, grupa aminowa w lizynie, tiolowa w cysteinie czy też grupa hydroksylowa przyłączona do pierścienia aromatycznego w tyrozynie. Immobilizacja poprzez wiązanie chemiczne wymaga stosowania dwufunkcyjnych związków sieciujących lub aktywujących odpowiednie grupy funkcyjne (np. kwasów dikarboksylowych, aldehydu glutarowego, karbodiimidu, bromocyjanin, heksametylenodiizocyjaniny, 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny) oraz niezbyt łagodnych, a często nawet drastycznych warunków, niepozostających obojętnymi dla struktury i działania enzymu [179]. Zakotwiczenie enzymu poprzez wiązanie chemiczne może prowadzić do zmian strukturalnych oraz konformacyjnych centrum aktywnego i spadku jego aktywności, a nawet całkowitej denaturacji.

Immobilizacja enzymu poprzez **sieciowanie** (*crosslinking*) może być realizowana na skutek oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy enzymem a nośnikiem. Zazwyczaj stosuje się je jako technikę, która ma na celu zabezpieczenie enzymu przed jego wymywaniem. Przykładem może tu być trypsyna zaadsorbowana na krzemionce, a następnie utrwalona z wykorzystaniem aldehydu glutarowego [180].

Omawiając immobilizację składników biologicznych w biosensorach, warto wspomnieć także o innej procedurze, polegającej na umieszczeniu biokatalizatora w matrycy z kompozytu węglowego. Bliskie sąsiedztwo centrów biokatalitycznego i reakcyjnego, możliwość wprowadzania innych związków, w tym kofaktorów, a także wysoka stabilność enzymów, łatwe odtwarzanie powierzchni i stosunkowo niskie koszty przygotowania tego typu

sensorów są niewątpliwie ich dużymi zaletami. Znane są sensory z pastą węglową, przygotowane metodą fotolitograficzną, jak również stałe matryce wiążące o ściśle zdefiniowanej strukturze. W dalszej części niniejszego rozdziału opisano materiały węglowe stosowane w biosensorach enzymatycznych.

Projektowanie i konstrukcja sensora enzymatycznego, poza opracowaniem efektywnej metody immobilizacji białkowego katalizatora, wymaga starannego doboru odpowiedniego elementu przetwornikowego. Ze względu na rodzaj zastosowanego przetwornika wyróżnia się układy optyczne, fluorescencyjne oraz najczęściej wykorzystywane (również komercyjnie), czujniki z detekcją elektrochemiczną. Wśród tego typu urządzeń najliczniejszą grupę stanowią sensory amperometryczne i potencjometryczne (wykorzystujące enzymatyczne elektrody jonoselektywne) oraz optyczne, znacznie mniej jest sensorów konduktometrycznych i kalorymetrycznych. Innym kryterium podziału sensorów enzymatycznych jest liczba enzymów unieruchamianych na przetworniku, co pozwala wyodrębnić układy jednoenzymowe (monoenzymatyczne) oraz wieloenzymowe (polienzymatyczne).

5.6.1 Układy jednoenzymowe

Sensory jednoenzymowe wykorzystują jeden enzym, katalizujący wybraną reakcję, należący do jednej z poniższych klas:

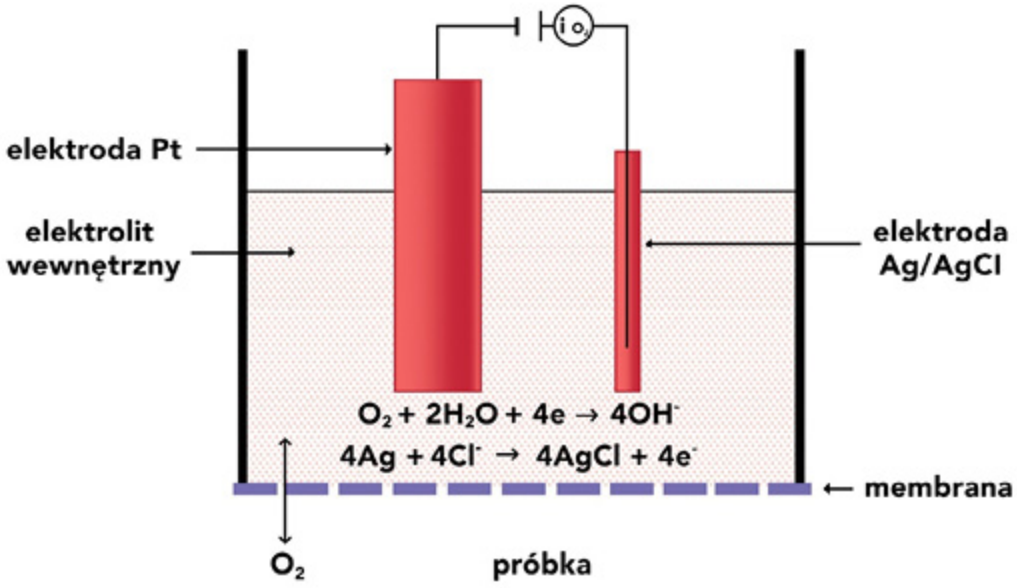
- *oksydoreduktazy* – enzymy katalizujące reakcje redoks, czyli utleniania i redukcji (np. oksydaza glukozy, oksydaza glutaminianowa, dehydrogenaza alkoholowa);
- *hydrolazy* – katalizujące reakcję hydrolizy (np. trypsyna);
- *transferazy* – katalizujące reakcje, w których dochodzi do przeniesienia grupy chemicznej, tj. grupy karboksylowej, tiolowej, metylowej, acylowej;
- *liazy* – katalizujące reakcje przyłączenia cząsteczek o niewielkich rozmiarach do wiązań typu C=C, C=O, C=N;
- *ligazy* – katalizujące reakcje tworzenia wiązań C–C, C–O, C–N, C–S;
- *izomerazy* – katalizujące reakcje izomeryzacji, w których dochodzi do przegrupowania w obrębie pojedynczej cząsteczki lub wielu cząsteczek (np. racemizacja).

Spośród wymienionych powyżej klas enzymów w sensorach enzymatycznych najczęściej wykorzystuje się oksydoreduktazy, wśród nich najbardziej powszechnie stosowanym jest oksydaza glukozowa (GOx) i dehydrogenaza glukozowa (GDH) w układach do oznaczenia poziomu glukozy w próbkach, także próbkach biologicznych (biosensory komercyjne). Te dwa enzymy różnią się wartością potencjału redoks, rodzajem kofaktorów, a także inną specyficznością wobec glukozy. Oksydaza glukozowa ma większą specyficzność w stosunku do substratu niż dehydrogenaza glukozowa, może wytrzymać skrajne warunki środowiskowe (pH, siła jonowa i temperatura), sposób jej pozyskania jest łatwy i tani, co zdecydowanie ułatwia proces produkcji sensorów. Powyżej wymienione zalety sprawiają, że GOx jest standardowym enzymem stosowanym w sensorach enzymatycznych dedykowanych

oznaczeniu glukozy. Innym enzymem używanym w sensorach tego typu, a dokładniej mówiąc w testach diagnostycznych, jest heksokinaza (HD) z klasy transferaz. Warto podkreślić, że test diagnostyczny z udziałem heksokinazy służy do pomiaru glukozy przy użyciu spektrofotometrii, natomiast biosensory oraz testy wykorzystujące GOx lub GDH należą w większości do urządzeń z detekcją amperometryczną.

(a) Amperometryczne sensory do oznaczania glukozy trzech generacji

Początki badań nad sensorami enzymatycznymi sięgają 1962 roku, kiedy amerykańscy naukowcy – biochemicy, prof. L.C. Clark i L. Lyons opracowali pierwszą tzw. elektrodę enzymatyczną, dedykowaną amperometrycznemu oznaczeniu glukozy [181]. Na powierzchni elektrody platynowej umieszczono membranę pokrytą octanem celulozy, która była półprzepuszczalna dla gazów i umożliwiała dostęp tlenu do elektrody. Pomiędzy tą membraną a membraną dializacyjną (wykonaną z poliwęglanów) został pułapkowany enzym – oksydaza glukozy. Membrana dializacyjna zapewniała dyfuzję cząsteczek glukozy do białka, jednocześnie odfiltrowując inne składniki obecne we krwi, zaburzające oznaczanie analitu (np. endogenny kwas moczowy, kwas askorbinowy, dopaminę, czy też leki, takie jak paracetamol). Ideowy schemat elektrody Clarka przedstawiono na rys. 5.32.



RYS. 5.32

Schemat amperometrycznej elektrody tlenowej Clarka

Pierwszy biosensor enzymatyczny wykorzystywał unieruchomioną na powierzchni elektrody pracującej oksydazę glukozową, która katalizuje utlenianie *β*-d-glukozy w obecności tlenu cząsteczkowego do glukonolaktonu ($C_6H_{10}O_6$), hydrolizującego następnie do kwasu glukonowego ($C_6H_{12}O_7$), z wydzieleniem nadtlenku wodoru:

$$\mathbf{C_6H_{12}O_6 + O_2 + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_7 + H_2O_2}$$

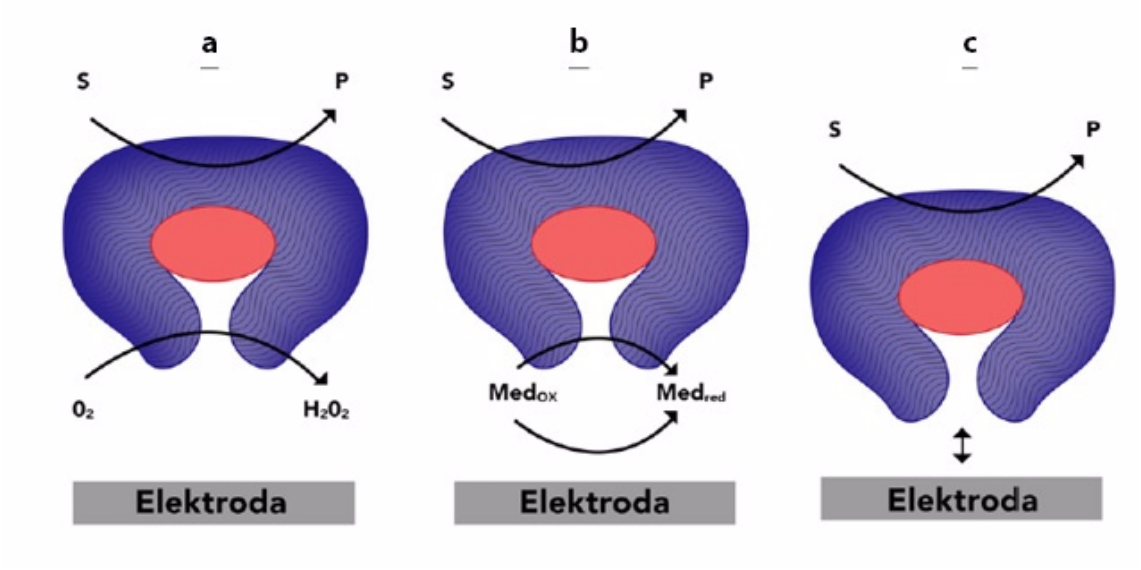
(5.2)

Zgodnie z równaniem 5.2 można oznaczać zarówno ubytek tlenu, jak i powstający w reakcji nadtlenek wodoru, a ich ilość jest proporcjonalna do stężenia glukozy w badanej próbce.

Strategie generowania sygnału analitycznego w amperometrycznych biosensorach glukozy zmieniały się na przestrzeni lat. Biorąc pod uwagę mechanizm przeniesienia

elektronu pomiędzy centrum aktywnym enzymu a powierzchnią elektrody, można wyróżnić trzy generacje biosensorów czułych na glukozę (rys. 5.33).

Działanie enzymatycznych biosensorów glukozy pierwszej generacji polega na wykorzystaniu tlenu jako naturalnego substratu oraz detekcji wytworzonego nadtlenku wodoru, tak jak w pionierskim układzie opracowanym przez Clarka i Lyonsa. Do osiągnięcia aktywności katalitycznej, oksydaza glukozowa wymaga obecności kofaktora redoks – dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD), pełniącego funkcję początkowego akceptora elektronów i przenośnika protonów oraz zapewniającego regenerację enzymu po reakcji. Forma utleniona oksydazy glukozowej (GOx-FAD) katalizuje utlenianie glukozy, a sama ulega redukcji do GOx-$FADH_2$ (5.3). Kolejnym etapem jest utlenianie przez tlen cząsteczkowy zredukowanej formy enzymu (GOx-$FADH_2$), czyli regeneracja kofaktora z wytworzeniem nadtlenku wodoru (5.4), podlegającego kolejno utlenieniu na anodzie platynowej (5.5). Elektroda rozpoznaje liczbę przenoszonych elektronów, która jest wprost proporcjonalna do liczby cząsteczek glukozy obecnych w próbce krwi.



RYS. 5.33

Zestawienie trzech generacji biosensorów enzymatycznych do oznaczania glukozy z detekcją amperometryczną: (A) I, (B) II i (C) III generacji, gdzie S – substrat, P – produkt

$$GOx - FAD + \text{glukoza} \rightarrow GOx(FADH_2) + \text{kwas glukozowy} \quad (5.3)$$

$$GOx - FADH_2 + O_2 \rightarrow GOx - FAD + H_2O_2 \quad (5.4)$$

$$H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^- \quad (5.5)$$

Szybkość redukcji tlenu można bezpośrednio skorelować ze stężeniem glukozy, które określa się na podstawie zmniejszonego stężenia tlenu lub zwiększonego stężenia nadtlenku wodoru. Niewątpliwie zaletą enzymatycznego sensora pierwszego rodzaju jest niekomplikowana budowa i prosty pomiar, co stwarza możliwość

wykorzystania w urządzeniach miniaturowych. Wadą takiego rozwiązania jest konieczność stosowania wysokich potencjałów podczas pomiarów stężenia nadtlenku wodoru. Powstający H_2O_2 może również wywoływać komplikacje, powodując denaturację enzymu. Biosensor pierwszej generacji jest także wrażliwy na zmienne stężenie tlenu w próbce badanej. Lokalne wyczerpywanie się tlenu niezbędnego do utleniania glukozy prowadziło do spadku wydajności reakcji enzymatycznej i generowania błędów w oznaczeniu analitu. Ograniczenia te, znane pod nazwą „niedobór/deficyt tlenu" wynikały z faktu, że typowe stężenie tlenu we krwi jest o około rząd wielkości mniejsze niż fizjologiczne stężenie glukozy.

Udoskonalenie biosensora glukozy I rodzaju osiągnięto poprzez zastąpienie tlenu syntetycznymi mediatorami, zazwyczaj unieruchamianymi na powierzchni elektrody, których zadaniem jest pośredniczenie w przekazywaniu elektronu pomiędzy enzymem a powierzchnią elektrody. Utlenianie glukozy jest katalizowane przez oksydazę glukozową w formie utlenionej (GOx-FAD), zgodnie z równaniem (5.3). Reakcje między kofaktorem FAD i powierzchnią elektrody przebiegają dalej według poniższych przemian. Zredukowana oksydaza glukozowa ulega utlenieniu za sprawą mediatora w postaci utlenionej (Me_{OX}), który sam redukuje się (5.6).

$$GOx - FADH_2 + 2Me_{OX} \rightarrow GOx(FAD) + 2Me_{RED} + 2H^+ \quad (5.6)$$

$$2Med_{RED} \rightarrow 2Med_{OX} + 2e^- \quad (5.7)$$

Zredukowany mediator jest z powrotem utleniany na elektrodzie (5.7), co generuje prąd proporcjonalny do stężenia glukozy w czasie regeneracji mediatora. Dzięki obecności mediatorów w biosensorach enzymatycznych drugiej generacji udało się wyeliminować problem związany ze zmianami stężenia tlenu. Stosowane mediatory są związkami wykazującymi aktywność redoks, działającymi jako przekaźniki elektronów oparte na mechanizmie dyfuzyjnym, który może skracać dystans pomiędzy centrum aktywnym biokatalizatora a elektrodą. Idealny mediator powinien wykazywać trwałość fizykochemiczną zarówno formy utlenionej, jak i zredukowanej, charakteryzować się wysoką szybkością wymiany elektronu dla pary redoks mediatora z elektrodą, czyli zapewniać efektywny proces przeniesienia elektronu. Potencjał pary redoks mediatora powinien być odpowiednio dobrany do potencjału redoks centrum aktywnego enzymu [182]. Najczęściej wykorzystywanymi mediatorami są ferrocen i jego pochodne, związki chinonu, błękit metylenowy, heksacyjanożelaziany, jak również kompleksy metali przejściowych [183].

Zastosowanie związków aktywnych redoks o małej masie molowej odpowiedzialnych za transport elektronów spowodowało, że na wyniki pomiarów praktycznie nie ma wpływu ciśnienie parcjalne tlenu. Jednakże, utlenianie zredukowanego GOx w obecności tlenu może występować mimo zastosowania syntetycznego mediatora, zwłaszcza jeśli tlen jest swobodnie rozproszony. Niski potencjał większości mediatorów wykorzystywanych w praktyce (mniejszy niż +0,7 V *vs.* Ag/AgCl, wymagany do utlenienia H_2O_2), minimalizuje, ale nie zawsze całkowicie eliminuje zachodzenie reakcji ubocznych endogennych związków redoks występujących w próbkach

rzeczywistych, zwłaszcza askorbinianów. Trudność w używaniu biosensorów drugiej generacji wynikała z faktu, że nie można było całkowicie wyeliminować zjawiska niepożądanego utleniania zredukowanej formy GOx, co miało znaczny wpływ na dokładność uzyskiwanych pomiarów stężenia glukozy, zwłaszcza w przypadku oznaczeń niskich stężeń. Ponadto niektóre aktywne redoks związki endogenne mogą również wpływać na zmianę stężenia syntetycznych mediatorów, generując dodatkowe błędy pomiarowe. Należy zaznaczyć, że większość układów z mediatorem charakteryzuje się niską stabilnością w czasie ciągłej pracy, znaczny problem stanowi potencjalne wymywanie i toksyczność mediatora. Dlatego też, najwięcej urządzeń sensorowych stosowanych *in vivo* należy do typu sensorów bezmediatorowych.

Działanie biosensorów III generacji opiera się na bezpośrednim przeniesieniu elektronów pomiędzy centrum aktywnym enzymu a powierzchnią elektrody, z pominięciem mediatora, co pozwala uzyskać wysoką selektywność detekcji analitu, dzięki pracy przy niskich potencjałach. Utlenianie glukozy katalizowane przez oksydazę glukozową w formie utlenionej (GOx-FAD) prowadzi do powstania kwasu glukonowego (5.3), a utlenianie zredukowanej formy enzymu zachodzi w wyniku bezpośredniego przeniesienia elektronu (5.8).

$$GOx - FADH_2 \rightarrow GOx(FAD) + 2e^- + 2H^+ \quad (5.8)$$

Decydujący wpływ na uzyskanie kontaktu elektrycznego ma immobilizacja enzymu we właściwej orientacji względem elektrody, tak aby centrum aktywne białka znajdowało się stosunkowo blisko

powierzchni, ale jednocześnie nie następowała denaturacja enzymu. Brak mediatorów w budowie biosensorów trzeciej generacji wyeliminował problemy związane z ich toksycznością i wchodzeniem w reakcje uboczne oraz ułatwił miniaturyzację takich urządzeń. Sensory te wykazują jednak gorszą czułość, a uzyskiwane wartości natężenia prądów katalitycznych są zazwyczaj niższe w porównaniu z sensorami drugiej generacji. Poważnym ograniczeniem w konstrukcji tej klasy układów są trudności w pokonaniu wewnętrznej bariery centrum aktywnego wielu enzymów, co jest spowodowane głębokim umiejscowieniem kofaktora wewnątrz białka.

Warto wspomnieć, że zamiast mediatorów w biosensorach enzymatycznych II rodzaju mogą z powodzeniem być stosowane organiczne materiały przewodzące, np. kompleksy typu CT (od ang. *charge-transfer*), czyli kompleksy z przeniesieniem ładunku, inaczej zwane kompleksami donorowo-akceptorowymi. Kompleksy takie powstają z połączenia chemicznego dwóch lub więcej cząsteczek/jonów albo różnych części jednej dużej cząsteczki, w którym za efekt wiążący odpowiada przejście elektronowe zmieniające rozkład ładunków, a w efekcie wytwarzające elektrostatyczne przyciąganie między częściami kompleksu. Przykładem układu CT jest kompleks TTF-TCNQ, czyli kompleks z przeniesieniem ładunku tetratiafulwalenu z tetracyjanochinonodimetanem [183].

W ciągu ostatnich lat znacznie wzrosło zainteresowanie różnymi nanomateriałami, głównie z uwagi na ich duży potencjał przy konstrukcji elektrod enzymatycznych, w tym dedykowanych detekcji glukozy. Ważną grupę stanowią odkryte w 1991 roku nanorurki

węglowe zbudowane z płaszczyzn grafenowych, zwijających się w cylindry [184]. Zastosowanie nanorurek węglowych (CNTs, *carbon nanotubes*), zarówno jednościennych (SWCNTs, *single-walled*), jak i wielościennych (MWCNTs, *multi-walled*) w biosensorach szybko stało się alternatywną matrycą dla unieruchomienia biokatalizatorów, do krzemionki czy ditlenku cyrkonu. Takie węglowe nanostruktury mają szereg zalet, w tym: stabilność w trudnych warunkach, wysoką przewodność elektryczną, rozwiniętą powierzchnię aktywną, co stwarza możliwość wzrostu reaktywności chemicznej i właściwości elektronicznych i wpływa na wzmocnienie aktywności katalitycznej enzymu (do dwóch razy więcej niż płaskie podłoże i do 10 razy więcej niż enzym natywny). Dzięki tym właściwościom sensory enzymatyczne z wykorzystaniem materiałów węglowych można z powodzeniem stosować do oznaczenia określonego analitu w próbkach biologicznych [185, 186]. W przypadku immobilizacji enzymu na nanorurkach węglowych stosuje się głównie oddziaływania niekowalencyjne, a konkretnie adsorpcję opartą na hydrofobowych oddziaływaniach pomiędzy enzymem a nanorurkami węglowymi, dzięki czemu zachowana zostaje konformacja enzymu [187]. Od kilku lat obserwuje się rozwój w projektowaniu biosensorów enzymatycznych z wykorzystaniem grafenu. Duża powierzchnia i właściwości elektrochemiczne tego materiału węglowego mogą zwiększyć się po unieruchomieniu elementu biologicznego na powierzchni elektrody, co stanowi bardzo ważny punkt przy konstrukcji bioczujników [188]. Opracowane zostały także złożone sensory m.in. do oznaczania glukozy oparte na hybrydowym układzie, w skład którego wchodzi kompozyt złożony z nanorurek węglowych i tlenku grafenu oraz

oksydazy glukozowej. Biosensor hybrydowy z wykorzystaniem nanostruktur węglowych, zaprojektowany przez Palanisamy i współpracowników cechował się wysoką czułością i szerokim zakresem liniowości (0,05–23,2 mM glukozy) [189].

(a) Komercyjne sensory do detekcji glukozy

Przełomowy wynalazek Clarka i Lyonsa z drugiej połowy lat 50. XX wieku rozpoczął intensywny rozwój dziedziny sensorów enzymatycznych, co stosunkowo szybko doprowadziło do konstrukcji układów, które znalazły zastosowanie w diagnostyce medycznej. Pierwszy egzemplarz czujnika glukozy został wprowadzony na skalę komercyjną przez firmę Yellow Springs Instruments (YSI) w 1973 roku [190]. Urządzenie to umożliwiało określenie stężenia glukozy na podstawie amperometrycznego pomiaru stężenia nadtlenku wodoru, analogicznie jak to przedstawiono w równaniu 5.2. Budowa tego sensora została później udoskonalona, ale do dziś jest on produkowany w wersji opartej na tej samej zasadzie pomiaru i stosowany w laboratoriach klinicznych do oznaczania zawartości glukozy w próbce krwi metodą standardową. Przyrząd YSI umożliwia dokładną i precyzyjną detekcję glukozy, a jego wskazania nie zależą od zawartości hematokrytu, czyli ilości krwinek czerwonych w próbce krwi. Produkcja biosensora YSI pociąga za sobą znaczne koszty, a opracowana technologia jego wytwarzania jest trudna do mininaturyzacji i dlatego nie może być wykorzystywany w warunkach domowych.

W kolejnych latach obserwowano intensywny rozwój biosensorów na glukozę. Wzrost zainteresowania ze strony firm medycznych, zainwestowane przez nie środki w badania naukowe sprawiły, że w 1976 roku pojawił się elektrochemiczny biosensor do detekcji glukozy w przyłóżkowym układzie zwanym sztuczną trzustką, natomiast w 1982 roku opracowano światłowodowy sensor na glukozę.

Pierwszy elektrochemiczny biosensor glukozy ExacTech w formie pasków testowych do użytku domowego, a więc przeznaczony do samokontroli przez pacjenta, udostępniła w 1987 roku firma MediSense Inc. Należał on do amperometrycznych urządzeń drugiej generacji, wykorzystujących oksydazę glukozową oraz ferrocen jako mediator w przenoszeniu elektronów z grupy flawinowej enzymu do powierzchni elektrody. Glukoza zawarta w próbce krwi mieszała się z odczynnikami na pasku, co powodowało powstawanie prądu elektrycznego, którego natężenie zależało od ilości glukozy we krwi. Glukometr (dostępny w formie pióra lub cienkiej karty, wielkością i kształtem przypominającą współczesne karty kredytowe) mierzył natężenie generowanego prądu, przeliczał wynik pomiaru na poziom glukozy we krwi, a uzyskana wartość stężenia glukozy pojawiała się na jego wyświetlaczu. Paski testowe MediSense otrzymywano w stosunkowo taniej technologii sitodruku, co pozwoliło na ich masową produkcję. Wykorzystanie tej technologii stało się później podstawą komercyjnych urządzeń pomiarowych do użytku domowego trzeciej generacji.

W 1991 roku rozpoczęła się produkcja jednych z najpopularniejszych wśród diabetyków biosensorów enzymatycznych o nazwie Glucocard [191]. W tym samym czasie

Szwedzka firma Angelholm wprowadziła na rynek glukometr HemoCue – pierwsze urządzenie wyposażone w fotometr o podwójnej długości fali (660 i 840 nm), wykorzystujące dehydrogenazę glukozową (GDH), diaforazę i sól tetrazoliową. HemoCue to przenośne analizatory opracowane do użytku profesjonalnego, obecnie wykorzystywane do badań przesiewowych oraz jako pomoc w diagnozowaniu cukrzycy, w tym cukrzycy ciążowej, a także stosowane podczas walidacji jako odniesienie dla innych metod. W 1992 firma i-Stat zaczęła sprzedaż opracowanych wcześniej miniaturowych biosensorów służących do pomiaru parametrów krwi. Obecnie wśród najpopularniejszych urządzeń do detekcji poziomu glukozy we krwi wymienia się następujące glukometry:

- StatStripTMGlucose Monitor (Nova Biomedical),
- Glucometer® (Bayer AG),
- Precision Xtra (ABBOTT Laboratories),
- seria urządzeń Accu-Check (Roche Diagnostic AG).

Mimo różnorodnych urządzeń do detekcji poziomu glukozy we krwi dostępnych na rynku, biosensory glukozowe są stale projektowane i ulepszane, z uwagi na fakt, że bardzo duża część populacji choruje na cukrzycę, czyli chorobę metaboliczną zaliczaną do grona jednych z najgroźniejszych i najbardziej rozpowszechnionych chorób cywilizacyjnych. Prowadzony regularnie i z odpowiednią częstością pomiar poziomu glukozy we krwi jest decydującym czynnikiem wskazującym na efektywność leczenia pacjentów dotkniętych cukrzycą. Dlatego też poszukiwanie i konstrukcja coraz czulszych biosensorów na glukozę stale pozostaje dużym wyzwaniem naukowo-badawczym. Ważnym kierunkiem

w rozwoju enzymatycznych sensorów na glukozę są **implantowalne układy elektrochemiczne**, co pociąga za sobą potrzebę miniaturyzacji projektowanych biosensorów (miniaturyzacja elektrod, źródeł mocy i elementów sensorycznych). Systemy przeznaczone do zastosowania w warunkach domowych muszą spełniać wiele wymagań konstrukcyjnych jak: (a) system jednorazowego użycia trwały przez okres co najmniej 18 miesięcy przy przechowywaniu w temperaturze pokojowej, (b) pomiar możliwy przy wykorzystaniu nierozcieńczonej próbki krwi – kropli o objętości mniejszej niż 1 µl, (c) trwale wykalibrowany sensor, (d) brak konieczności używania dodatkowych odczynników, (e) łatwość stosowania oraz (f) niski koszt analizy.

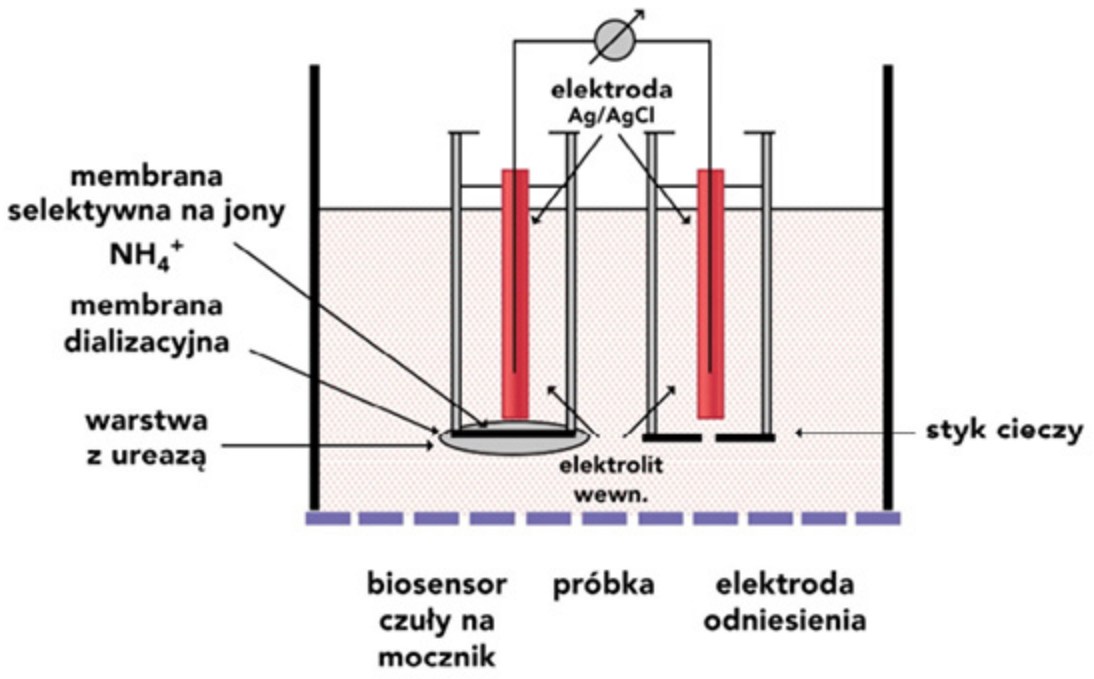
Warto podkreślić, że obecnie w monitorowaniu poziomu glukozy główną rolę odgrywają glukometry i współpracujące z nimi paski testowe zawierające enzym, które według obowiązującej ścisłej definicji nie powinny być nazywane biosensorami. Biorąc pod uwagę, że nie są to urządzenia wielokrotnego użytku, przeznaczone do pomiaru stężenia glukozy w sposób ciągły, poprawnie powinno klasyfikować się je jako jednorazowe testy diagnostyczne.

(b) Elektrochemiczne sensory do oznaczania analitów innych niż glukoza

Prace nad sensorami przeznaczonymi do badania poziomu glukozy w płynach ustrojowych człowieka zapoczątkowały drogę rozwoju

różnorodnych układów biodetekcji opartej na katalizie enzymatycznej. Rosnące zapotrzebowanie na oznaczanie związków biologicznie aktywnych, innych niż glukoza na niskich poziomach stężeń i w próbkach o małej objętości, doprowadziło do konstrukcji m.in. sensorów na mocznik, kwas moczowy, lipidy czy cholesterol [192].

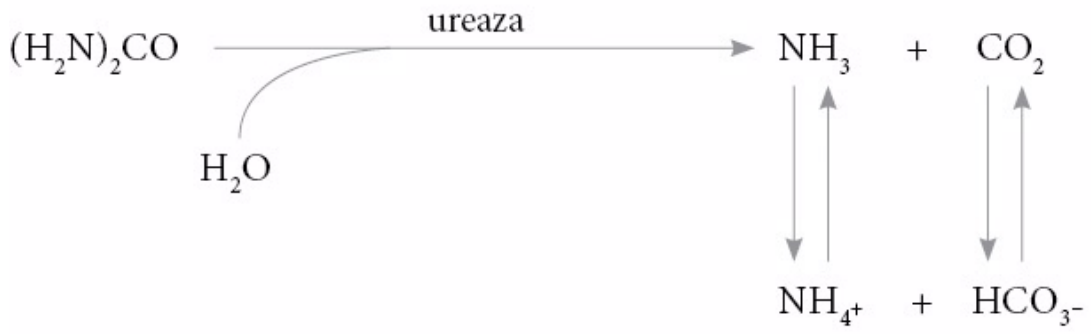
Kilka lat po wynalazku enzymatycznej elektrody Clarka i Lyonsa, dzięki pracom Guilbauta oraz Montalvo (1996) pojawił się pierwszy potencjometryczny biosensor dedykowany oznaczaniu mocznika w roztworze. Z uwagi na to, że mocznik jest głównym produktem końcowym metabolizmu białek i innych związków azotowych w organizmie, określenie jego poziomu we krwi i moczu pozwala na ocenę prawidłowości pracy nerek. Pierwszy sensor na mocznik wykorzystywał enzym ureazę zaimmobilizowaną na przetworniku, który stanowiła elektroda jonoselektywna (ISE od *ion selective electrode*) zawierająca membranę z plastyfikowanego poli(chlorku winylu). Membrana była dodatkowo wyposażona w nonaktynę – jonofor selektywnie kompleksujący jony amonowe, zgodnie z poniższym schematem (rys. 5.34).



RYS. 5.34

Schemat budowy i działania potencjometrycznego biosensora na mocznik

Działanie sensora było oparte na hydrolizie mocznika, katalizowanej przez ureazę, do amoniaku i ditlenku węgla:



RYS. 5.35

Schemat reakcji biosensora enzymatycznego na mocznik

Zmiana stężenia jonów amonowych powstałych w środowisku reakcji powodowała zmianę potencjału elektrody ISE, a więc zmianę sygnału analitycznego rejestrowanego przez detektor. Należy wspomnieć, że endogenne kationy amonowe i kationy potasu, które występują w wysokich stężeniach w próbkach krwi czy moczu, mogą zakłócać prawidłową analizę mocznika. Wpływ jonów amonowych jako interferentów można uwzględnić poprzez jednoczesne oznaczanie ich zawartości za pomocą drugiej elektrody ISE, selektywnej na te jony, ale niepokrytej ureazą, i wprowadzić odpowiednią korektę do sygnału otrzymanego za pomocą elektrody ISE przeznaczonej do detekcji mocznika. Analogicznie można uwzględnić wpływ jonów potasu, mierząc sygnał drugiej ISE selektywnej na kationy potasu. Warto wspomnieć, że produkty enzymatycznej hydrolizy mocznika powodują lokalną zmianę pH środowiska, co sprawia, że elektrody pH mogą zostać wykorzystane jako sensory wewnętrzne w układach przeznaczonych do detekcji mocznika. Niestety, silna zależność sygnału czujnika od pojemności buforowej oznaczanych próbek w takim przypadku zmniejsza jego czułość, zwiększając jednocześnie dolną granicą oznaczalności. Elektroda pH do oznaczania mocznika nie jest jednak wrażliwa na interferencje alkaliczne, co niewątpliwe jest zaletą w porównaniu do elektrody selektywnej na jony amonowe.

Innym bioanalitem, oznaczanym z wykorzystaniem miniaturowych sensorów jest kwas moczowy, będący głównym związkiem azotowym w moczu. Wyraźne odchylenia ilości kwasu moczowego od ustalonych norm diagnostycznych są symptomami chorób takich, jak zapalenie płuc, śmiertelne zatrucie chloroformem czy metanolem, zatrucia ciążowe, choroby układu sercowo-

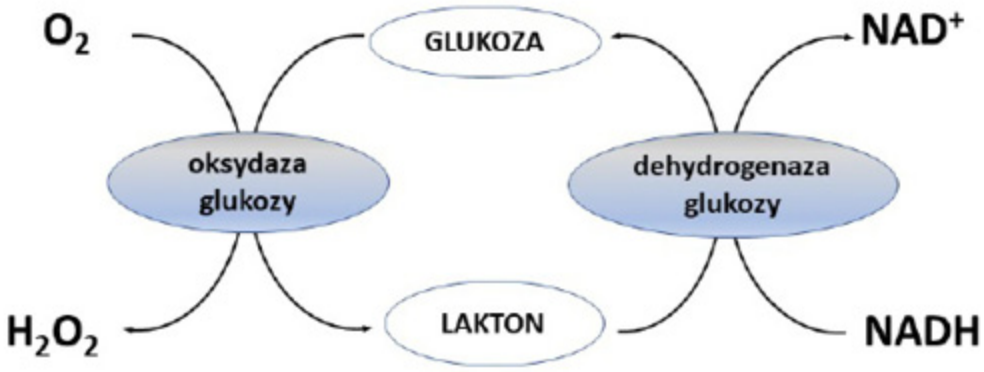
naczyniowego. Monitorowanie zawartości tego bioanalitu w płynach fizjologicznych jest również ważne u pacjentów z zaburzeniami metabolizmu puryn. Biosensor na kwas moczowy jest odpowiednim narzędziem do analizy zawartości puryn, która nie wymaga wieloetapowego i czasochłonnego przygotowania próbki (surowicy), jak w przypadku standardowo stosowanych metod. Obecnie do oznaczenia poziomu kwasu moczowego w próbkach biologicznych powszechnie stosowane są miniaturowe układy z detekcją elektrochemiczną. Na rynku są dostępne paskowe testy sensorowe przeznaczone do szybkiej analizy kwasu moczowego w kropli krwi pobranej od pacjenta.

5.6.2
Układy wieloenzymowe

W biosensorach wieloenzymowych funkcje katalizatora i receptora pełni więcej niż jeden enzym unieruchomiony na elemencie detekcyjnym. Zastosowanie kombinacji dwóch lub większej liczby enzymów pozwoliło na konstrukcję nowych biosensorów do detekcji substancji, których nie udało się oznaczyć za pomocą urządzeń monoenzymatycznych (jak w przypadku oznaczenia sacharozy), a także polepszyło parametry użytkowe sensora glukozowego, mleczanowego i przeznaczonego do detekcji kreatyniny, w stosunku parametrów biosensorów osiągniętych przy wykorzystaniu jednego enzymu, takich jak selektywność i czas życia.

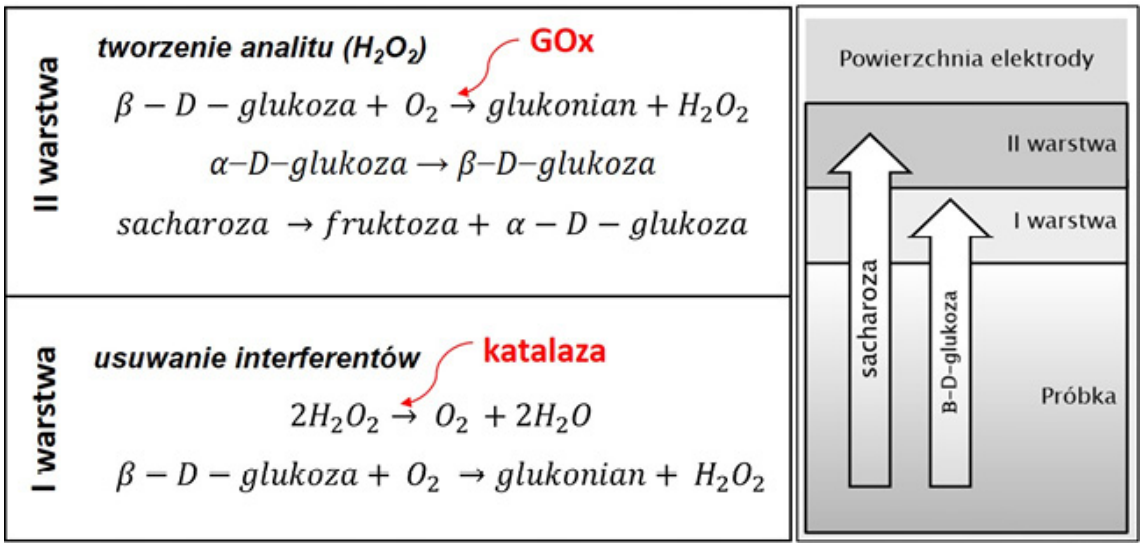
Połączenie działania dwóch enzymów w sensorze do amperometrycznej detekcji glukozy miało na celu wzmocnienie

sygnału analitycznego poprzez obieg glukozy – oznaczanego analitu, czy też usuwanie produktów przeszkadzających w jego pomiarze (rys. 5.36). Zużycie tlenu było monitorowane w trakcie obiegu glukozy a sygnał rejestrowany na elemencie detekcyjnym był wzmocniony w porównaniu do biosensora glukozy, w którym na 1 mol glukozy zużywany jest dokładnie 1 mol tlenu [193].



RYS. 5.36
Schemat reakcji dwuenzymowego sensora glukozowego

W konstrukcji **układu wieloenzymowego do oznaczania sacharozy** wykorzystano kombinację trzech enzymów (katalaza współimmobilizowana z oksydazą glukozową i oksydazą galaktozową) na powierzchni elektrody tlenowej stanowiącej element detekcyjny [194]. Przemiany zachodzące w takim biosensorze, można podzielić na reakcje związane z tworzeniem nadtlenku wodoru oraz reakcje mające na celu usuwanie interferentów (rys. 5.37). Poziom sacharozy w badanej próbce jest proporcjonalny do wzrostu stężenia nadtlenku wodoru, czy też ubytku tlenu.



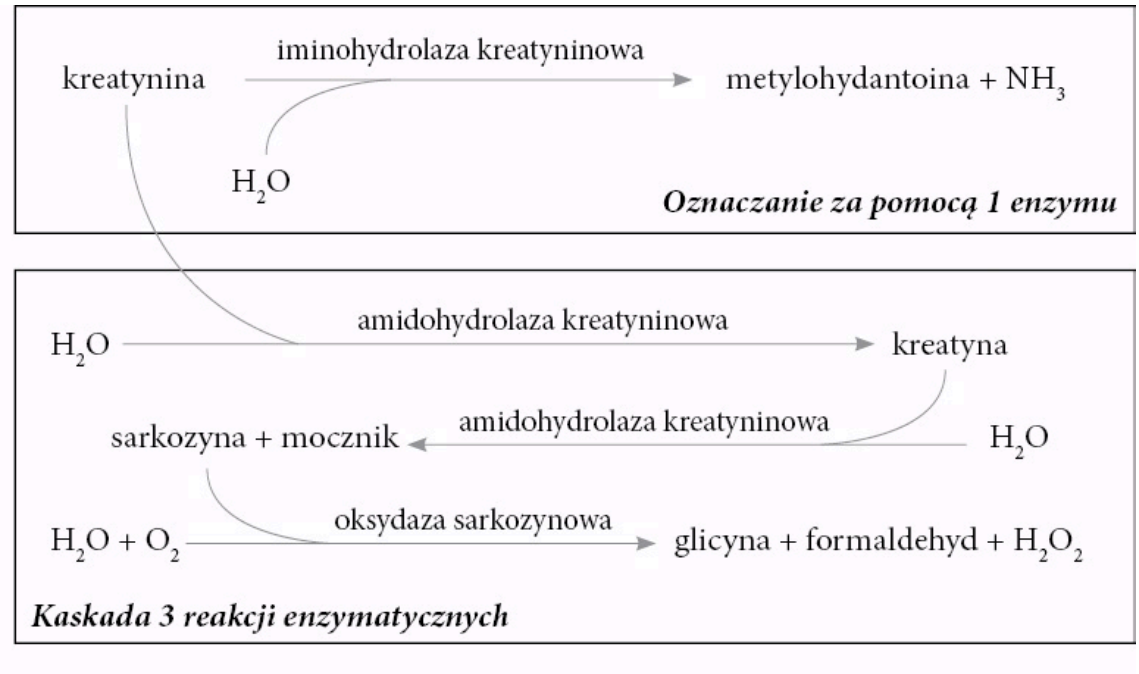
RYS. 5.37

Schemat biosensora enzymatycznego do detekcji sacharozy

Główny problemem wykorzystania takiego biosensora jest całkowite wyeliminowanie wpływu substancji przeszkadzających i *β*-d-glukozy. W tym celu stosuje się warstwę wstępną (I warstwa) z wymienionymi trzema enzymami, które efektywnie usuwają *β*-d-glukozę, zanim przedyfunduje ona do warstwy wewnętrznej (II warstwa). Oznaczanym za pomocą tego sensora analitem jest nadtlenek wodoru, ponieważ tlen jest także zużywany w warstwie wstępnej.

Na szczególną uwagę zasługuje s**ensor elektrochemiczny do detekcji kreatyniny**, czyli metabolitu, którego stężenie częściowo odzwierciedla stan nerek, mięśni i tarczycy [195]. Dokładne i szybkie określenie stężenia kreatyniny jest ważne w diagnostyce zaburzeń w funkcjonowaniu tych narządów. Kreatynina może być oznaczana za pomocą jednej reakcji enzymatycznej (sensor jednoenzymowy), jak i kaskady 3 reakcji enzymatycznych wtedy, gdy w reakcji enzymatycznej nie powstaje bezpośrednio nadtlenek wodoru.

W przypadku następujących po sobie 3 reakcji enzymatycznych najpierw zachodzi hydroliza kreatyniny do kreatyny, która jest również hydrolizowana do sarkozyny, utlenianej do glicyny. W następstwie tej ostatniej reakcji zostaje zużywany tlen i powstaje nadtlenek wodoru, dzięki czemu możliwa jest detekcja amperometryczna. Monoenzymatyczna hydroliza kreatyniny natomiast prowadzi do powstania jonów amonowych, dzięki czemu można zastosować tę reakcję do oznaczania potencjometrycznego, analogicznego do opisanego wcześniej oznaczania mocznika, w którym funkcję czujnika wewnętrznego może pełnić elektroda pH lub elektroda czuła na kationy amonowe.

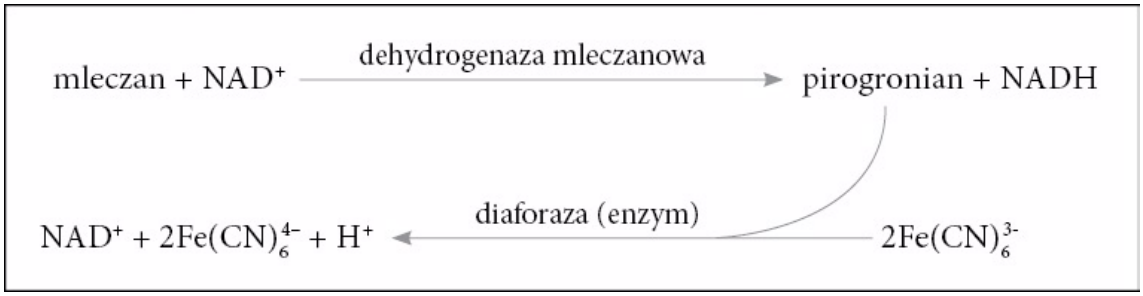


RYS. 5.38

Schemat reakcji biosensora enzymatycznego do oznaczania kreatyniny [196]

Wśród sensorów zawierających w swojej konstrukcji więcej niż jeden enzym opracowano również **wieloenzymatyczny biosensor**

do oznaczania mleczanów. Urządzenie działa w oparciu o dehydrogenazę z koenzymem NAD (dinukleotyd nikotynamidoadeninowy) oraz inny enzym z grupy oksydoreduktaz, diaforazę, katalizującymi reakcje zachodzące zgodnie z poniższym schematem (rys. 5.39). Zastosowany heksacyjanożelazian (III) pełni funkcję mediatora obniżającego potencjał utleniający z +0,8 V dla NADH do +0,3 V względem elektrody chlorosrebrowej.



RYS. 5.39
Schemat reakcji biosensora enzymatycznego na mleczany [196]

Biosensory enzymatyczne z detekcją optyczną

Poza najbardziej rozpowszechnionymi przetwornikami elektrochemicznymi opracowano również przetworniki korzystające z różnicy w świetle wyemitowanym lub zaabsorbowanym pomiędzy reagentami i produktami. Reakcje katalityczne w biosensorach wykorzystujących enzymy mogą być z powodzeniem łączone z takim rodzajem detekcji, czyli z **detekcją optyczną** [173]. W tym przypadku informacja chemiczna o próbce podlega przetwarzaniu w warstwie enzymatycznej na skorelowany ze stężeniem analitu

sygnał optyczny (np. zmiana barwy, intensywności fluorescencji czy absorpcji promieniowania elektromagnetycznego). Przetwornik przekształca zmiany parametrów optycznych warstwy receptorowej na końcowy, mierzalny sygnał analityczny. Transmisja sygnału optycznego pomiędzy elementami biosensora odbywa się poprzez włókna światłowodowe, dzięki którym straty przenoszonego promieniowania są niewielkie. Zastosowanie pojedynczych włókien czy też wiązki światłowodów doprowadziło do opracowania sensorów optycznych o niezwykle małych rozmiarach (poniżej 1 mm, a w przypadku wykorzystania włókien przewężanych nawet poniżej 1 μm).

Warto zaznaczyć, że konstrukcja enzymatycznych biosensorów z detekcją optyczną wymaga immobilizacji białka w warstwie receptorowej lub na powierzchni końcówki włókna światłowodowego. Wśród tego typu biosensorów można wyróżnić: (1) układy, w których reakcja chemiczna stanowi etap pośredni między reakcją enzymatyczną i właściwym pomiarem optycznym oraz (2) reakcja enzymatyczna wykorzystuje lub generuje optycznie czynne substancje. Bardzo często do warstwy receptorowej sensorów optycznych jest wprowadzany odczynnik (absorpcyjny lub fluorescencyjny wskaźnik organiczny), który oddziałując z analitem (np. w reakcji kwasowo-zasadowej, kompleksowania czy też reakcji redoks) zmienia swoje właściwości optyczne w zależności od jego stężenia. Parametry pracy takiego biosensora optycznego tj. czułość, selektywność i zakres pomiarowy w znacznym stopniu zależą od właściwości zastosowanego wskaźnika. Szczególnie korzystne okazuje się stosowanie wskaźników fluorescencyjnych z uwagi na ich wysoką czułość i selektywność rozpoznawania. Pomiar zmian

parametrów optycznych warstwy receptorowej wykorzystującej enzym jako element biokatalityczny polega na rejestracji stopnia pochłonięcia promieniowania o odpowiedniej długości fali lub intensywności wtórnego promieniowania fluorescencyjnego, w funkcji stężenia badanego składnika w próbce. W praktyce, promieniowanie ze źródła światła, np. diody elektroluminescencyjnej, wprowadzone do włókna światłowodowego dociera do warstwy receptorowej, gdzie w zależności od użytego wskaźnika ulega modyfikacji i następnie jest kierowane do detektora, np. fotodiody.

Jako pierwszy biosensor enzymatyczny z detekcją optyczną opracowano układ do oznaczania glukozy w moczu, wyposażony w pasek celulozowy pokryty warstwą dwóch enzymów – oksydazy glukozowej oraz peroksydazy. Glukoza znajdująca się w badanej próbce była utleniana analogicznie jak w przypadku elektrody Clarka, natomiast powstający nadtlenek wodoru ulegał reakcji redoks z ortotolidyną, co prowadziło do wytworzenia barwnego produktu. Uzyskiwana zmiana zabarwienia była wprost proporcjonalna do stężenia glukozy. Początkowo zmianę barwy oceniano wizualnie, ale z czasem ten typ odczytu zastąpiono obiektywnym pomiarem reflektancji.

Innym rozwiązaniem konstrukcyjnym w sensorach optycznych na glukozę było użycie warstwy receptorowej zawierającej oksydazę glukozową (immobilizowaną na końcówce sensora optycznego) i zastosowanie wskaźnika fluoroforowego (np. różnego typu kompleksów rutenowych) czułego na obecność tlenu wygaszającego jego fluorescencję. Reakcja utleniania glukozy, katalizowana przez enzym, wymaga udziału tlenu, którego zawartość jest odwrotnie

proporcjonalnie do stężenia analitu. Im więcej glukozy w badanej próbce, tym większy deficyt tlenu niezbędnego do utleniania glukozy pojawia się w membranie chemoczułej (umieszczonej na czole światłowodu). Prowadzi to do zmniejszenia wygaszania fluorescencji wskaźnika, co z kolei powoduje zwiększenie intensywności fluorescencji.

Różnego rodzaju tzw. suche testy zostały opracowane dla szeregu analitów i obecnie znajdują zastosowanie w codziennej praktyce laboratoryjnej. Oprócz „suchych testów" na glukozę są często wykorzystywane m.in. do detekcji mocznika. W takim enzymatycznym biosensorze z detekcją optyczną pod wpływem ureazy zachodzi hydroliza mocznika, a powstający węglan amonu zmienia pH, co powoduje zmianę barwy wskaźnika pH zaimmobilizowanego na pasku testowym). Analogicznie działają sensory optyczne wykorzystujące enzymy jako element biologiczny warstwy receptorowej np. do oznaczania cholesterolu (enzym: oksydaza cholesterolowa), czy bilirubiny (enzym: oksydaza bilirubinowa).

Biosensory enzymatyczne z innymi systemami detekcji

Reakcjom biokatalitycznym zachodzącym przy udziale enzymów towarzyszy zazwyczaj stosunkowo duża zmiana entalpii (głównie wydzielanie ciepła,) co można wykorzystać do opracowania enzymatycznych biosensorów termicznych. Ciepło uwalnianie w wyniku zachodzącej w warstwie receptorowej reakcji

enzymatycznej (o charakterze egzotermicznym) z udziałem analitu jest mierzone za pomocą termistora. Konstrukcja większości tego typu biosensorów jest zbliżona do opisywanych powyżej elektrod enzymatycznych przy wykorzystaniu odpowiednio dobranych metod immobilizacji enzymu. Bezpośrednie unieruchomienie białka na końcówce termistora, częściowo zamkniętego szklaną powłoką, pozwala na zredukowania strat ciepła do otaczającego roztworu próbki. Przykładem takiego biosensora jest enzymatyczny termistor z immobilizowaną oksydazą glukozy lub ureazą. W praktyce pomiar sygnału takich urządzeń jest przeprowadzany względem układu odniesienia, którym jest sensor termiczny bez enzymu [173].

Biosensory enzymatyczne mogą być projektowane także na podstawie przetworników grawimetrycznych, dając **piezoelektryczne sensory masowe**. Działanie takich sensorów, wykorzystujących mikrowagę kwarcową (QCM, *quartz crystal microbalance*), polega na pomiarze częstotliwości drgań kryształu kwarcowego (generowanych z wykorzystaniem prądu zmiennego) w funkcji zmian jego masy. W konsekwencji następuje zmiana masy analitu, który osadza się na powierzchni płytki kwarcowej. Warto podkreślić, że detektory grawimetryczne (piezoelektryczne) umożliwiają oznaczanie bardzo małych ilości badanej substancji, ponieważ pomiary zmian częstotliwości należą do jednych z najbardziej precyzyjnych i stabilnych.

Biosensory enzymatyczne – podsumowanie

Rozwój technologiczny i cywilizacyjny, stale rosnące wymogi dotyczące ochrony środowiska, a przede wszystkim konieczność stawiania szybkiej i trafnej diagnozy medycznej na podstawie prostych i tanich analiz laboratoryjnych przyczyniły się do intensywnych prac nad biosensorami enzymatycznymi. W literaturze można znaleźć liczne doniesienia na temat prostych i złożonych (hybrydowych) czujników enzymatycznych dedykowanych detekcji bardzo dużej liczbie analitów [197, 198]. Jednak w rzeczywistości na rynku są dostępne handlowo sensory do oznaczania zaledwie kilku czy kilkunastu analitów, z czego najbardziej rozpowszechnionym, wykorzystywanym zarówno w analizatorach klinicznych, jak i warunkach domowych (szybkie testy – paski diagnostyczne niezwykle użyteczne w samokontroli przez pacjenta) jest sensor do detekcji poziomu glukozy [199]. Szacuje się, że aż ok. 85–90% rynku wszystkich biosensorów stanowią sensory glukozowe, ze względu na stale zwiększającą się liczbę chorych na cukrzycę, która stała się chorobą cywilizacyjną w krajach rozwiniętych. Szczególnie dla takich pacjentów korzystne byłoby opracowanie sztucznej trzustki, czyli urządzenia pracującego w trybie ciągłym i dozującego podskórnie insulinę (pompa insulinowa), co umożliwiłoby diabetykom przeciwdziałanie wyniszczającej chorobie. Kluczowym elementem takiego układu jest czujnik umożliwiający ciągły monitoring glukozy we krwi, dlatego też dalszy postęp w sensorach glukozowych będzie prowadził do zaprojektowania i opracowania

biokompatybilnych, wszczepialnych urządzeń do oznaczania glukozy. Dotychczas udało się skonstruować takie urządzenia, które działają przez kilka dni, ale nie nadają się do długotrwałego stosowania, ponieważ ulegają rozlegulowaniu wskutek zanieczyszczenia.

Literatura

1. Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S., „Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification", *Pure Appl. Chem.*, 1999, **71** (12), 2333–2348.
2. Felix F.S., Angnes L., „Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications", *Biosens. Bioelectron.*, 2018, **102**, 470–478.
3. Arruda D.L., Wilson W.C., Nguyen C., Yao Q.W., Caiazzo R.J., Talpasanu I., Dow D.E., Liu B.C.-S., „Microelectrical sensors as emerging platforms for protein biomarker detection in point-of-care diagnostics", *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2009, **9**(7), 749–755.
4. Lin J., Ju H., „Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers", *Biosens. Bioelectron.*, 2005, **20**, 1461–1470.
5. Uliana C.V., Riccardi C.S., Yamanaka H., „Diagnostic tests for hepatitis C: Recent trends in electrochemical immunosensor and genosensor analysis", *World J. Gastroenterol.*, 2014, **20**, 15476–15491.
6. Hasanzadeh M., Shadjou N., „Advanced nanomaterials for use in electrochemical and optical immunoassays of carcinoembryonic antigen. A review", *Microchim. Acta*, 2017, **184**, 389–414.
7. Campuzano S., Yanez-Sedeno P., Pingarron J.M., „Electrochemical bioaffinity sensors for salivary biomarkers detection", *Trends Anal. Chem.*, 2017, **86**, 14–24.
8. Eivazzadeh-Keihan R., Pashazadeh P., Hejazi M., de la Guardia M., Mokhtarzadeh A., „Recent advances in Nanomaterial-mediated Bio and immune sensors for

detection of aflatoxin in food products", *Trends Anal. Chem.*, 2017, **87**, 112–128.

9. Harper H.A., Rodwell V.W., Mayers P.A., *Zarys chemii fizjologicznej*, wyd. 17, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1983, s. 593–594.

10. Nezlin R., *The immunoglobulins: structure and function*, Academic Press, San Diego 1998.

11. Lydyard P.M., Fanger M.W., Whelan A., *Immunologia. Krótkie wykłady*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.

12. Basu M., Lenka S.S., Paichha M., Swain B., Patel B., Banerjee R., Jayasankar P., Das S., Samanta M., „Immunoglobulin (Ig) D in labeo rohita is widely expressed and differentially modulated in viral, bacterial and parasitic antigenic challenges", *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2016, **179**, 77–84.

13. Goldsby R., Kindt T.J., Osborne B.A., Kuby J., *Immunology*, W.H. Freeman and Company, New York 2003.

14. Zieliński M., Płucienniczak A., „Przeciwciała monoklonalne – zastosowanie w medycynie", *Biotechnologia*, 2009, **2**, 113–122.

15. Sędek Ł., Mazur B., „Przeciwciała monoklonalne i poliklonalne i ich zastosowanie w cytometrii przepływowej", *Postępy Biologii Komórki*, 2008, **35**, 17–34.

16. Lipman N.S., Jackson L.R., Trudel L.J., Weis-Garcia F., „Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources", *ILAR Journal*, 2005, **46**(3), 258–68.

17. Boenisch T., „Diluent buffer ions and pH: their influence on the performance of monoclonal antibodies in immunohistochemistry", *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 1999, **7**, 300–306.

18. Suri C.R., Raje M., Varshney G.C., „Immunosensors for pesticide analysis: antibody production and sensor development", *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2002, **22**, 15–32.

19. Riccardi C.S., da Costa P.I., Yamanaka H., „Imunossensor amperométrico", *Quim. Nova*, 2002, **25**, 316–320.

20. Litvak-Greenfeld D., Benhar I., „Risks and untoward toxicities of antibody-based immunoconjugates", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, **64**(15), 1782–1799.

21. Hughes B., „Antibody-drug conjugates for cancer: poised to deliver?", *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2010, **9**(9), 665–667.

22. Hildebrandt I.J., Gambhir S.S., „Molecular imaging applications for immunology", *Clin. Immunol.*, 2004, **111**(2), 210–224.

23. Nelson A.L., „Antibody fragments", *mAbs*, 2010, **2**(1), 77–83.

24. Siontorou C.G., „Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy", *Inter. J. Nanomed.*, 2013, **8**, 4215–4227.

25. Vashist S.K., Luong J.H.T., „Antibody Immobilization and surface functionalization chemistries for immunodiagnostics" w: *Handbook of immunoassay technologies: approaches, performances, and applications* (Eds. Vashist S.K., Luong J.H.T.), Elsevier, Londyn 2018, s. 19-46

26. Welch N.G., Scoble J.A., Muir B.W., Pigram P.J., „Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review)", *Biointerphases*, 2017, **12**, 02D301:1–13.

27. Wang C., Feng B., „Research progress on site-oriented and three-dimensional immobilization of protein", *Mol. Biol.*, 2015, **49**, 1–20.

28. Orlov A.V., Bragina V.A., Nikitin M.P., P.I. Nikitin, „Rapid dry-reagent immunomagnetic biosensing platform based on volumetric detection of nanoparticles on 3D structures", *Biosens. Bioelectron.*, 2016, **79**, 423–429.

29. Lei C., Shin Y., Liu J., Ackerman E.J., „Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support", *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 11242–11243.

30. Mera K., Nagai M., Brock J.W., Fujiwara Y., Murata T., Maruyama T., Baynes J.W., Otagiri M., Nagai R., „Glutaraldehyde is an effective cross-linker for production of antibodies against advanced glycation end-products", J. Immunol. Methods, 2008, **334**, 82–90.

31. Peng Y., Van Gelder V., Amaladoss A., Patel K.H., „Covalent binding of antibodies to cellulose paper discs and their applications in naked-eye colorimetric immunoassays", *J. Vis. Exp.*, 2016, **116**, 54111.

32. Garnett M.C., „Targeted drug conjugates: principles and progress", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, **53**, 171–216.

33. Stobiecka M., Chalupa A., Dworakowska B., „Piezometric biosensors for anti-apoptotic protein survivin based on buried positive-potential barrier and immobilized monoclonal antibodies", *Biosens. Bioelectron.*, 2016, **84**, 37–43.

34. Baldini F., *Optical Chemical Sensors*, Springer, New York 2006, s. 387–401.

35. Seo J., Lee S., Dale Poulter C., „Regioselective covalent immobilization of recombinant antibody binding proteins A, G, and protein L for construction of antibody arrays", *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 8973–8980.

36. Shen M., Rusling J., Dixit Ch.K., „Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnostics development", *Methods*, 2017, **116**, 95–111.

37. Gao D., McBean N., Schultz J.S., Yan Y., Mulchandani A., Chen W., „Fabrication of antibody arrays using thermally responsive elastin fusion proteins", *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 676–677.

38. Choe W., Durgannavar T.A., Chung S.J., „Fc-binding ligands of immunoglobulin G: an overview of high affinity proteins at peptides", *Materials*, 2016, **9**(12), 1–17.

39. Svensson H., Hoogenboom H.R., Sjöbring U., „Protein LA, a novel hybrid protein with unique single-chain Fv antibody- and Fab-binding properties*", Eur. J. Biochem.*, 1998, 258, 890–896.

40. Akerstrom B., Bjorck L., „A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties", *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**, 10240–10247.

41. Rodrigo G., Gruvegard M., Van Alstine J.M., „Antibody fragments and their purification by protein L affinity chromatography", *Antibodies*, 2015, **4**, 259–277.

42. Turkova J., „Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function", *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 1999, **722**, 11–31.

43. Cho I.H., Paek E.H., Lee H., Kang J.Y., Kim T.S., Paek S.H., „Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces", *Anal. Biochem.*, 2007, **365**, 14–23.

44. Feldkamp U., Wacker R., Banzhaf W., Niemeyer C.M., „Microarray-based *in vitro* evaluation of DNA oligomer libraries designed in silico", *ChemPhysChem*, 2004, **5**, 367–372.

45. Wacker R., Niemeyer C.M., „DDI-mFIA-A readily configurable microarray-fluorescence immunoassay based on DNA-directed immobilization of proteins", *ChemBioChem*, 2004, **5**, 453–459.

46. Paul W.E., *Fundamental immunology*, Lippincott Williams&Wilkins, Wolters Kluwer business, 2013, s. 129–149.

47. Zhu G., Yin X., Jin D., Zhang B., Gu Y., An Y., „Paper-based immunosensors: Current trends in the types and applied detection techniques", *Trends Anal. Chem.*, 2019, **111**, 100–117.

48. Mak A.C., Osterfeld S.J., Yu H., Wang S.X., Davis R.W., Jejelowo O.A., Pourmand N., „Sensitive giant magnetoresistive-based immunoassay for multiplex mycotoxin detection", *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **25**(7), 1635–1639.

49. Zou Z.W., Kai J.H., Rust M.J., Han J., Ahn C.H., „Functionalized nano interdigitated electrodes arrays on polymer with integrated microfluidics for direct bio-affinity sensing using impedimetric measurement", *Sensor. Actuat. A-Phys.*, 2007, **136**(2), 518–526.

50. Ramanavicius A., Finkelsteinas A., Cesiulis H., Ramanaviciene A., „Electrochemical impedance spectroscopy of polypyrrole based electrochemical immunosensor", *Bioelectrochemistry*, 2010, **79**(1), 11–16.

51. Grieshaber D., MacKenzie R., Voros J., Reimhult E., „Electrochemical biosensors – Sensor principles and architectures", *Sensors*, 2008, **8**(3), 1400–1458.

52. Corry B., Uilk J., Crawley C., „Probing direct binding affinity in electrochemical antibody-based sensors", *Anal. Chim. Acta*, 2003, **496**(1–2), 103–16.

53. Pattnaik P., „Surface plasmon resonance - Applications in understanding receptor-ligand interaction", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2005, **126**(2), 79–92.

54. Kyprianou D., Chianella I., Guerreiro A., Piletska E.V., Piletsky S.A., „Development of optical immunosensors for detection of proteins in serum", *Talanta*, 2013, **103**, 260–266.

55. Law W.C., Yong K.T., Baev A., Hu R., Prasad P.N., „Nanoparticle enhanced surface plasmon resonance biosensing: Application of gold nanorods", *Optics Express*, 2009, **17**(21), 19041–19046.

56. Law W.C., Yong K.T., Baev A., Prasad P.N., „Sensitivity improved surface plasmon resonance biosensor for cancer biomarker detection based on plasmonic enhancement", *ACS Nano*, 2011, **5**(6), 4858–4864.

57. Pohanka M., Skladal P., „Piezoelectric immunosensor for the direct and rapid detection of Francisella tularensis", *Folia Microbiol.*, 2007, **52**(4), 325–330.

58. Wang Y.X., Ye Z.Z., Ying Y.B., „New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria", *Sensors*, 2012, **12**(3), 3449–3471.

59. Zalecenie Komisji Europejskiej 2011/696/UE z dnia 18 października 2011 r. dotyczące definicji nanomateriału. Dz. Urz. UE L 275/38, s. 3 z 20.10.2011.

60. Doria G., Conde J., Veigas B., Giestas L., Almeida C., Assuncao M., Rosa J., Baptista P.V. „Noble metal nanoparticles for biosensing applications", *Sensors*, 2012, **12**(2), 1657–1687.

61. Jeong W.J., Bu J., Kubiatowicz L.J., Chen S.S., Kim Y., Hong S. „Peptide-nanoparticle conjugates: a next generation of diagnostic and therapeutic platforms?", *Nano Convergence*, 2018, **5**(1), 38 (1–18).

62. Rani D., Pachauri V., Madaboosi N., Jolly P., Vu X.T., Estrela P., Chu V., Conde J.P., Ingebrandt S., „Top-Down fabricated silicon nanowire arrays for field-effect detection of prostate-specific antigen", *ACS Omega*, 2018, **3**(8), 8471–8482.

63. Tran D.P., Pham T.T.T., Wolfrum B., Offenhausser A., Thierry B., „CMOS-compatible silicon nanowire field-effect transistor biosensor: technology development toward commercialization", *Materials*, 2018, **11**(5), 785 (1–26).

64. Szunerits S, Boukherroub R., „Graphene-based biosensors", *Interface Focus*, 2018, **8**(3), 20160132.

65. Gao C., Guo Z., Liu J.H., Huang X.J., „The new age of carbon nanotubes: An updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors", *Nanoscale*, 2012, **4**(6), 1948–1963.

66. Yanez-Sedeno P., Gonzalez-Cortes A., Agui L., Pingarron J.M., „Uncommon carbon nanostructures for the preparation of electrochemical immunosensors", *Electroanalysis*, 2016, **8**(8), 1679–1691.

67. Singhal R., Orynbayeva Z., Sundaram R.V.K., Niu J.J., Bhattacharyya S., Vitol E.A., Schrlau M.G., Papazoglou E.S., Friedman G., Gogotsi Y., „Multifunctional carbon-nanotube cellularendoscopes", *Nature Nanotech.*, 2011, **6**, 57–64.

68. Duffy M.J., „Clinical use of tumor biomarkers: An overview", *Clin. Biochem. Metab.*, 2015, **25**(46), 157–161.

69. Sharma S., Zapatero-Rodríguez J., Estrela P., O'Kennedy, R., „Point-of-care diagnostics in low resource settings: Present status and future role of microfluidics", *Biosensors*, 2015, **5**, 577–601.

70. Syedmoradi L., Norton M.L., Omidfar K., „Point-of-care cancer diagnostic devices: From academic research to clinical translation", *Talanta*, 2021, **225**, 122002.

71. Craig Venter J., et. al., „The sequence of the human genome", *Science*, 2001, 291, 1304–1351.

72. Jain K.K., „Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics", *Clin. Chim. Acta*, 2005, **358**, 37–54.

73. Kruger K., Grabowski P.J., Zaug A.J., Sands J., Gottschling D.E., Cech T.R., „Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena", *Cell*, 1982, **31**, 147–157.

74. Navani N. K., Li Y., „Nucleic acid aptamers and enzymes as sensors", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, **10**, 272–281.

75. Teller C., Willner I., „Functional nucleic acid nanostructures and DNA machines", *Curr. Opin. Biotech.*, 2010, **21**(4), 376–391.

76. Stoltenburg R., Reinemann C., Strehlitz B., „SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinitynucleic acid ligands", *Biomol. Eng.*, 2007, **24**, 381–403.

77. Janata J., *Principles of Chemical Sensors*, Springer 2009, s. 23–24.

78. Tombelli S., Minunni M., Mascini M., „Analytical applications of aptamers", *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, **20**(12), 2424–2434.

79. Li Y., Lu Y., *Functional nucleic acids for analytical applications*, Springer 2009.

80. Grosjean H., *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution*, Landes Bioscience 2009.

81. Sullenger B.A., Gilboa E., „Emerging clinical applications of RNA", *Nature*, 2002, **418**, 252–258.

82. Boomer R.M., Lewis S.D., Healy J.M., Kurz M., Wilson C., McCauley T.G., „Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues", *Oligonucleotides*, 2005, **15**, 183–195.

83. Famulok M., „Allosteric aptamers and aptazymes as probes for screening approaches", *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2005, **7**, 137–143.

84. Ravelet C., Peyrin E., „Recent developments in the HPLC enantiomeric separation using chiral selectors identified by a combinatorial strategy", *J. Separ. Sci.*, 2006, **29**, 1322–1331.

85. Lu Y., Liu J., „Smart nanomaterials inspired by biology: dynamic assembly of error-free nanomaterials in response to multiple chemical and biological stimuli", *Acc. Chem. Res.*, 2007, **40**, 315–323.

86. Katz E., Willner I., „Nanobiotechnology: integrated nanoparticle–biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 6042–6108.

87. Rajendran M., Ellington A.D., „Selecting nucleic acids for biosensor applications", *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2002, **5**, 263–270.

88. Jarczewska M., Górski Ł., Malinowska E., „Electrochemical aptamer-based biosensors as potential tools for clinical diagnostics", *Anal. Methods*, 2016, **8**, 3861–3877.

89. Di Giusto D.A., King G.C., „Special-purpose modifications and immobilized functional nucleic acids for biomolecular interactions", *Top. Curr. Chem.*, 2005, 261, 131–168.

90. He P., Xu Y., Fang Y., „A review: Electrochemical DNA biosensors for sequence recognition", *Anal. Lett.*, 2005, **38**, 2597–2623.

91. Geng T., Bao N., Gall O.Z., Lu C., „Modulating DNA adsorption on silica beads using an electrical switch", *Chem. Commun.*, 2009, **7**, 800–802.

92. Polska K., Fiedurek J., Radzki S., „Bioenkapsulacja związków aktywnych biologicznie w matrycach otrzymanych metodą zol-żel i jej zastosowanie", *Biotechnologia*, 2007, **1**, 77–95.

93. Heise C., Bier F.F., „Immobilization of DNA on microarrays", *Top. Curr. Chem.*, 2005, **261**, 1–25.

94. Pan S., Rothberg L. „Chemical control of electrode functionalization for detection of DNA hybridization by electrochemical impedance spectroscopy". *Langmuir*, 2005, **21**, 1022–1027.

95. Prats-Alfonso E., García-Martín F., Bayo N., Cruz L.J., Pla-Roca M., Samitier J., Errachid, A., Albericio, F. „Facile solid-phase synthesis of biotinylated alkyl thiols". *Tetrahedron*, 2006, **62**, 6876–6881.

96. Rant U., Arinaga K., Fujita S., Yokoyama N., Abstreiter G., Tornow M., „Dynamic electrical switching of DNA layers on a metal surface", *Nano Lett.*, 2004, **4**, 2441–2445.

97. Cooper J. M., *Biosensors: A Practical Approach*, OXFORD, Oxford 2004.

98. Love J.C., Estroff L.A., Kriebel J.K., Nuzzo R.G., Whitesides G.M., „Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology", *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 1103–1169.

99. Schwartz D.K., „Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation", *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2001, **52**, 107–137.

100. Whitesides G.M., Laibinis P.E., „Wet chemical approaches to the characterization of organic surfaces: Self-assembled monolayers, wetting, and the physical-organic chemistry of the solid-liquid interface", *Langmuir*, 1990, **6**, 87–96.

101. Petrenko V.F., Peng S., „Reduction of ice adhesion to metal by using self-assembling monolayers (SAMs)", *Can. J. Phys.*, 2003, **81**, 387–393.

102. Burleigh T.D., Gu Y., Donahey G., Vida M., Waldeck D.H., „Tarnish protection of silver using a hexadecanethiol self-assembled monolayer and descriptions of accelerated tarnish tests", *Corrosion*, 2001, **57**, 1066–1074.

103. Shchepinov M.S., Case-Green S.C., Southern E.M., „Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays", *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 1155–1161.

104. Steel A.B., Herne T.M., Tarlov M.J., „Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold", *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4670–4677.

105. Simonsson, T., „G-quadruplex DNA structures – Variations on a theme", *Bol. Chem.*, 2001, **382**, 621–628.

106. Luderer F., Walschus U., „Immobilization of oligonucleotides for biochemical sensing by self-assembled monolayers: Thiol-organic bonding on gold and silanization on silica surfaces", *Top. Curr. Chem.*, 2005, **260**, 37–56.

107. Keighley S.D., Li P., Estrela P., Migliorato P., „Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy". *Biosens. Bioelectron.*, 20082, **3**, 1291–1297.

108. Wang J., „Electrochemical nucleic acid biosensors", *Anal. Chim. Acta*, 2002, **469**, 63–71.

109. Paleček E., Jelen F., „Electrochemistry of Nucleic Acids", *Perspectives in Bioanalysis*, 2005, **1**, 73–173.

110. Boussicault F., Robert M., „Electron transfer in DNA and in DNA-related biological processes. Electrochemical insights", *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2622–2645.

111. Kerman K., Kobayashi M., Tamiya E., „Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology", *Meas. Sci. Technol.*, 2004, **15**, R1–R11.

112. Mascini M., Papamichael K., Mevola I., Pravda M., Guilbault G.G., „Ghrelin detection using spiegelmer-capture molecules", *Anal. Lett.*, 2007, **40**, 403–430.

113. Kowalczyk A., Nowicka A.M., Karbarz M., Stojek Z., „Thermoresponsive polymeric gel as a medium for examining interactions between dsDNA and an anticancer drug", *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **392**, 463–469.

114. Reynisson J., et. al., „Intercalation of trioxatriangulenium ion in DNA: Binding, electron transfer, X-ray crystallography, and electronic structure", *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 2072–2083.

115. Haq, I., „Thermodynamics of drug-DNA interactions", *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, **403**, 1–15.

116. Hajian R., Shams N., Parvin A., „DNA-binding studies of daunorubicin in the presence of methylene blue by spectroscopy and voltammetry techniques", *Chin. J. Chem.*, 2009, **27**, 1055–1060.

117. Wong E.L.S., Erohkin P., Gooding J.J., „A comparison of cationic and anionic intercalators for the electrochemical transduction of DNA hybridization via long range electron transfer", *Electrochem. Commun.*, 2004, **6**, 648–654.

118. Bazhulina N.P. et al., „Binding of Hoechst 33258 and its derivatives to DNA", *J. Biomol. Struct. Dynam.*, 2009, **26**, 701–718.

119. Zhu N., Cai H., He P., Fang Y., „Tris(2,2′-bipyridyl)cobalt(III)-doped silica nanoparticle DNA probe for the electrochemical detection of DNA hybridization", *Anal. Chim. Acta*, 2003, **481**, 181–189.

120. Sassolas A., Blum L.J., Béatrice D.L.-B., „Electrochemical Aptasensors", *Electroanal.*, 2009, **21**, 1237–1250.

121. Radi A.-E., Sanchez J.L.A., Baldrich E., O'Sullivan C.K., „Reusable Impedimetric Aptasensor", *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 6320–6323.

122. Lai R. Y., Plaxco K. W., Heeger A. J., „Aptamer-Based Electrochemical Detection of Picomolar Platelet-Derived Growth Factor Directly in Blood Serum", *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 229–233.

123. Farjami E., Campos R., Nielsen J.S., Gothelf K.V., Kjems J., Ferapontova E.E., „RNA Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Selective and Label-Free Analysis of Dopamine", *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 121−128.

124. Yao W., Wang L., Wang H., Zhang X., Li L., „An aptamer-based electrochemiluminescent biosensor for ATP detection", *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, **24**, 3269–3274.

125. Wang C., Qian J., Wang K., Yang X., Liu Q., Hao N., Wang C., Dong X., Huang X., „Colorimetric aptasensing of ochratoxin A using Au@Fe3O4 nanoparticles as signal indicator and magnetic separator", *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, **77**, 1183–1191.

126. Yanga C., Wanga Y., Marty J.-L., Yang X., „Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator", *Biosen. Bioelectron.*, 2011, **26**, 2724–2727.

127. Ma Y.-D., Li K.-H., Chen Y.-H., Ma H.-P., Lee G.-B., „A sample-to-answer, portable platform for rapid detection of pathogens with a smartphone interface", *Lab on a Chip*, 2019, **19**, 3804–3814.

128. Heller M.J., „DNA microarray technology: Devices, Systems, and Applications", *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2002, **4**, 129–153.

129. Chu N., Liang Q., Hao W., Jiang Y., Liang P., Zeng R.J., „Microbial electrochemical sensor for water biotoxicity monitoring", *Chem. Eng. J.*, 2021, **404**, 127053.

130. Hill A., Tait S., Baillie C., Virdis B., McCabe B., „Microbial electrochemical sensors for volatile fatty acid measurement in high strength wastewaters: A review", *Biosens. Bioelectron.*, 2020, **165**, 112409.

131. Gupta N., Renugopalakrishnan V., Liepmann D., Paulmurugan R., Malhotra B.D., „Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives", *Biosens. Bioelectron.*, 2019, **141**, 111435.

132. Jiang Y., Yang X., Liang P., Liu P., Huang X., „Microbial fuel cell sensors for water quality early warning systems: Fundamentals, signal resolution, optimization and future challenges", *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 2018, **81**, 292–305.

133. Nakamura H., Shimomura-Shimizu M., Karube I., *Biosensing for the 21st Century*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2008, s. 351–394.

134. Clark L.C., Wolf R., Granger D., Taylor Z., „Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography", *J. Appl. Physiol.*, 1953, 6, 189–193.

135. Raval R., Raval K., *Biochemical and Cellular Aspects of Microbial Sensing: Making Sense of Applied Parameters*, Wiley-Blackwell, Hoboken 2018, s. 253–

266.

136. Il'yasov P.V., Emel'yanova E.V., Eroshin V.K., Reshetilov A.N., „Determination of Glucose in Fermentation Media by a Microbial Sensor upon Cultivation of Fungi of the Genus Mucor", *Appl. Biochem. Microbiol.*, 1996, **32**, 86–90.

137. Karube I., Tamiya E., „Biosensors for food industry", *Food Biotechnol.*, 1987, **1**, 147–165.

138. Chunxiang X., Gang L., Haobin C., Yue X., „Microbial sensor for on-line determination of microbial population in a fermenter", *Sens. Actuators B Chem.*, 1993, **12**, 45–48.

139. Ohashi E., Karube I., „Sensors for the food industry", *Food Control*, 1993, **4**, 183–188.

140. Voronova E.A., Iliasov P.V., Reshetilov A.N., „Development, investigation of parameters and estimation of possibility of adaptation of *Pichia angusta* based microbial sensor for ethanol detection", *Anal. Lett.*, 2008, **41**, 377–391.

141. Wen G., Wen X., Shuang S., Choi M.M.F., „Whole-cell biosensor for determination of methanol", *Sens. Actuators B Chem.*, 2014, **201**, 586–591.

142. Gonchar M.V., Maidan M.M., Moroz O.M., Woodward J.R., Sibirny A.A., „Microbial O_2- and H_2O_2-electrode sensors for alcohol assays based on the use of permeabilized mutant yeast cells as the sensitive bioelements", *Biosens. Bioelectron.*, 1998, **13**, 945–952.

143. Tkac J., Vostiar I., Gemeiner P., Sturdik E., „Monitoring of ethanol during fermentation using a microbial biosensor with enhanced selectivity", *Bioelectrochemistry*, 2002, **56**, 127–129.

144. Wang Y.-F., Tsujimura S., Kano K., „Amperometric detection of acetate based on mediated bioelectrocatalysis using *Escherichia coli* cells cultivated with acetate", *Electrochemistry*, 2008, **76**, 631–633.

145. Hikuma M., Kubo T., Yasuda T., Karube I., Suzuki S., „Amperometric determination of acetic acid with immobilized *Trichosporon brassicae*", *Anal. Chim. Acta.*, 1979, **109**, 33–38.

146. Habib O., Demirkol D.O., Timur S., „Sol-Gel/Chitosan/Gold Nanoparticle-Modified Electrode in Mediated Bacterial Biosensor", *Food Anal. Methods*, 2012, **5**, 188–194.

147. Hikuma M., Obana H., Yasuda T., Karube I., Suzuki S., „Amperometric determination of total assimilable sugars in fermentation broths with use of immobilized whole cells", *Enzyme Microb. Technol.*, 1980, **2**, 234–238.

148. Karube I., Matsunaga T., Teraoka N., Suzuki S., „Microbioassay of phenylalanine in blood sera with a lactate electrode", *Anal. Chim. Acta*, 1980, **119**, 271–276.

149. Bayram E., Akyilmaz E., „Development of a new microbial biosensor based on conductive polymer/multiwalled carbon nanotube and its application to paracetamol determination", *Sens. Actuators B Chem.*, 2016, **233**, 409–418.

150. Karube I., Matsunaga T., Suzuki S., „Microbioassay of nystatin with a yeast electrode", *Anal. Chim. Acta*, 1979, **109**, 39–44.

151. Zhang Z.T., Wang D.B., Li C.Y., Deng J.Y., Zhang J.B., Bi L.J., Zhang X.E., „Microbial sensor for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*", *J. Appl. Microbiol.*, 2018, **124**, 286–293.

152. Rastogi S., Kumar A., Mehra N.K, Makhijanic S.D., Manoharan A., Gangal V., Kumar R., „Development and characterization of a novel immobilized microbial membrane for rapid determination of biochemical oxygen demand load in industrial waste-waters", *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **18**, 23–29.

153. Li Y., Sun J., Wang J., Biana C., Tong J., Li Y., Xia S., „A single-layer structured microbial sensor for fast detection of biochemical oxygen demand", *Biochem. Eng. J.*, 2016, **112**, 219–225.

154. Pham T.T.P., Nguyen P.H.D., Nguyen T.T.V., Duong H.T.L., „Self-build packed-bed bioreactor for rapid and effective BOD estimation*", Environ. Sci. Pollut.*, 2019, **26**, 25656–25667.

155. Chee G.-J., Nomura Y., Ikebukuro K., Karube I, „Stopped-flow system with ozonizer for the estimation of low biochemical oxygen demand in environmental samples", *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 3092–3098.

156. Chee G.-J., Nomura Y., Ikebukuro K., Karube I., „Development of photocatalytic biosensor for the evaluation of biochemical oxygen demand", *Biosens. Bioelectron.*, 2005, **21**, 67–73.

157. Jiang Y., Xiao L.-L., Zhao L., Chen X., Wang X., Wong K.-Y., „Optical biosensor for the determination of BOD in seawater", *Talanta*, 2006, **70**, 97–103.

158. Górski Ł., Trzebuniak K.F., Malinowska E., „Low BOD determination methods: The state-of-the-art", *Chem. Process Eng.*, 2012, **33**, 629–637.

159. Oota S., Hatae Y., Amada K., Koya H., Kawakami M., „Development of mediated BOD biosensor system of flow injection mode for shochu distillery wastewater", *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **26**, 262–266.

160. Hooi K.B., Ismail A.K., Ahamad R., Shahir S., „A redox mediated UME biosensor using immobilized *Chromobacterium violaceum* strain R1 for rapid biochemical oxygen demand measurement", *Electrochim. Acta*, 2015, **176**, 777–783.

161. Nakamura H., Suzuki K., Ishikuro H., Kinoshita S., Koizumi R., Okuma S., Gotoh M., Karube I., „A new BOD estimation method employing a double-mediator system by ferricyanide and menadione using the eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*", *Talanta*, 2007, **72**, 210–216.

162. Zaitseva A.S., Arlyapov V.A., Yudina N.Y., Alferov S.V., Reshetilov A.N., „Use of one- and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii*", *Enzyme Microb. Technol.*, 2017, **98**, 43–51.

163. Matsunaga T., Karube I., Suzuki S., „Some observations on immobilized hydrogen-producing bacteria: Behavior of hydrogen in gel membranes", *Biotechnol. Bioeng.*, 1980, **22**, 2607–2615.

164. Sonawane J.M., Ezugwu C.I., Ghosh P.C., „Microbial Fuel Cell-Based Biological Oxygen Demand Sensors for Monitoring Wastewater: State-of-the-Art and Practical Applications", *ACS Sens.*, 2020, **5**, 2297–2316.

165. Hao S., Sun X., Zhang H., Zhai J., Dong S., „Recent development of biofuel cell based self-powered biosensors", *J. Mater. Chem. B*, 2020, **8**, 3393–3407.

166. Mohseni M., Abbaszadeh J., Maghool S.-S., Chaichi M.-J., „Heavy metals detection using biosensor cells of a novel marine luminescent bacterium *Vibrio*

sp. MM1 isolated from the Caspian Sea", *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **148**, 2018, 555–560.

167. Woutersen M., Van der Gaag B., Abrafi B.A., Mink J., Marks R.S., Wagenvoort, A.J., Ketelaars H.A.M., Brouwer, B., Heringa, M.B., „Development and validation of an on-linewater toxicity sensor with immobilized luminescent bacteria for on-line surface water monitoring", *Sensors*, 2017, **17**, 2682.

168. Filipović-Kovačević Ž., Mikšaj M., Šalamon D., „Cyanide determination in fruit brandies by an amperometric biosensor with immobilised *Saccharomyces cerevisiae*", *Eur. Food Res. Technol.*, 2002, **215**, 347–352.

169. Ahn Y., Schröder U., „Microfabricated, continuous-flow, microbial three-electrode cell for potential toxicity detection", *Biochip J.*, 2015, **9**, 27–34.

170. Chen P.-H., Lin C., Guo K.-H., Yeh Y.-C., „Development of a pigment-based whole-cell biosensor for the analysis of environmental copper", *RSC Adv.*, 2017, **7**, 29302–29305.

171. Wan X., Volpetti F., Petrova E., French C., Maerkl S.J., Wang B., „Cascaded amplifying circuits enable ultrasensitive cellular sensors for toxic metals", *Nat. Chem. Biol.*, 2019, **15**, 540–548.

172. Kim J., Jia H., Wang P., „Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells", *Biotechnol. Adv.*, 2006, **24**, 296–308.

173. Nguyen H.H., Lee S.H., Lee U.J., Fermin C.D., Kim M., „Immobilized Enzymes in Biosensor Applications", *Materials*, 2019, **12**, 121.

174. Brena B.M., Batista-Viera F., „Immobilization of Enzymes and Cells" w: *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells,* Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2006, s. 15–30

175. Brady D., Jordaan J., „Advances in enzyme immobilisation", *Biotechnol. Lett.*, 2009, **31**, 1639–1650.

176. Trevan M.D., „Enzyme immobilization by adsorption", *Meth. Mol. Biol.*, 1988, 3, 481–489.

177. Cosnier S., Mousty C., Gondran C., Lepellec A., „Entrapment of enzyme within organic and inorganic materials for biosensor applications: comparative study",

Mater. Sci. Eng. C, 2006, **26**, 442–447.

178. Betancor L., Luckarift H.R., „Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis", *Trends Biotechnol.*, 2008, **26**, 566–572.

179. Hanefeld U., Gardossi L., Magner E., „Understanding enzyme immobilisation", *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 453–468.

180. Govarthan P., „Crosslinking of enzymes for improved stability and performance", *Curr. Opin. Biotech.*, 1999, **10**, 331–335.

181. Heineman W.R., Jensen W.B., „Leland C. Clark Jr. (1918–2005)", *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 1403–1404.

182. Chaubey A., Malhotra B.D., „Mediated biosensors", *Biosens. Bioelectron.*, 2002, 17, 441–456.

183. Wang, J., „Electrochemical glucose biosensors", *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 814–825.

184. Iijima S., „Helical microtubules of graphitic carbon", *Nature*, 1991, **354**, 56–58.

185. Zhu Z., „An Overview of Carbon Nanotubes and Graphene for Biosensing Applications", *Nano-Micro Lett.*, 2017, **9**(25), 1–24.

186. Sireesha M., Jagadeesh Babu V., Sandeep A., Kiran K., Ramakrishna R., „A review on carbon nanotubes in biosensordevices and their applications in medicine", *Nanocomposites*, 2018, **4**, 36–57.

187. Feng W., Ji P., „Enzymes immobilized on carbon nanotubes", *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29**, 889–895.

188. Kim Y.R, Bong S., Kang Y.J, Yang Y., Mahajan R.K., Kim J.S., Kim H., „Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using graphene modified electrodes", *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **25**, 2366–2369.

189. Palanisamy S., Cheemalapati S., Chen S.-M., „Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase dispersed in multiwalled carbon nanotubes/graphene oxide hybrid biocomposite", *Mater. Sci. Eng. C*, 2014, **34**, 207–213.

190. Newman J.D., Tigwell L.J., Warner P.J., Turner A.P.F.. Biosensors: boldly going into the new millennium", *Sens. Rev.*, 2001, **21**, 268–271.

191. Thevenot D., Toth K., Dust R.,Wilson G., „Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (Technical Report)", *Pure Appl. Chem.*, 1999, **71**, 2333–2348.

192. Ahn K.W., Sampson N.S., „Cholesterol oxidase senses subtle changes in lipid bilayer structure", *Biochem.*, 2004, **43**, 827–836.

193. Wollenberger U., Schubert F., Pfeiffer D., Scheller F.W., „Enhancing biosensor performance using multienzyme systems", *Trends Biotechnol.*, 1993, **11**, 255–262.

194. Bertrand C., Coulet P.R., Gautheron D.C., „Multipurpose electrode with different enzyme systems bound to collagen films", *Anal. Chim. Acta*, 1981, **126**, 23–34.

195. Lad U., Khokhar S., Kale G.M., „Electrochemical Creatinine Biosensors", *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 7910–7917.

196. Brzózka Z. (red.), *Mikrobioanalityka*, Oficyna Wydawnicza PW, Warszawa 2009, rozdział 10, s. 149–183.

197. Bahadır E.B., Sezginturk M.K., „Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses", *Anal. Biochem.*, 2015, **478**, 107–120.

198. Tavakolian-Ardakani Z., Hosu O., Cristea C., Mazloum-Ardakani M., Marrazza G., „Latest Trends in Electrochemical Sensors for Neurotransmitters: A Review", *Sensors*, 2019, **19**, 2037.

199. Yoo E.H., Lee S.Y. "Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice", *Sensors*, 2010, **10**, 4558–4576.

6

Sensory chemiczne wykorzystujące nanomateriały w warstwach receptorowych

6.1 Klasyfikacja i podstawowe właściwości nanomateriałów

Marcin DROZD, Aleksandra SZUPLEWSKA

Do kategorii **nanomateriałów** zalicza się obiekty o zróżnicowanym składzie i kształtach. Mają one jednak cechę wspólną w postaci co najmniej jednego wymiaru mniejszego niż 100 nanometrów. Z racji

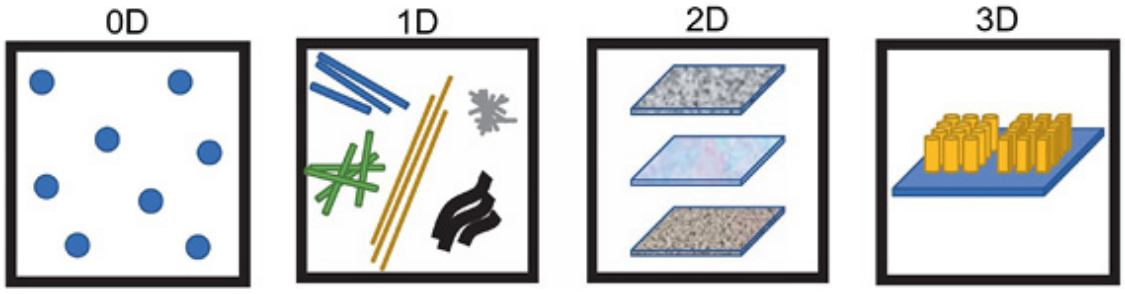
silnego rozdrobnienia, a co za tym idzie dużego stosunku powierzchni do objętości, na właściwości tych obiektów wpływ mają efekty kwantowe oraz powierzchniowe – wynikające z obecności wysokoenergetycznych atomów. Właściwości fizykochemiczne nanoobiektów są znacząco odmienne od ich makroskopowych odpowiedników i dodatkowo mogą być sterowane ich morfologią i rozmiarem. Fakt ten, w połączeniu z rozmiarami kompatybilnymi z receptorami molekularnymi i bioreceptorami, czyni z nanomateriałów atrakcyjne komponenty możliwe do zastosowania w warstwach receptorowych i pośrednich sensorów. Nanomateriały są na tyle małe, że po odpowiedniej funkcjonalizacji powierzchni wykazują one stabilność koloidalną w roztworach. Są też zdolne do tworzenia struktur wyższego rzędu, utrzymywanych siłami oddziaływań niekowalencyjnych, czego przykładem są koniugaty nanomateriałów z bioreceptorami. Jednocześnie rozmiary nanomateriałów są na tyle duże, że mogą one pełnić funkcję platform do immobilizacji receptorów czy komponentów warstw pośrednich, a ich warstwy funkcjonować jako przetworniki.

W zależności od rodzaju nanomateriału i jego docelowego zastosowania, do otrzymywania nanostruktur wykorzystuje się metody opierające się na „budowaniu” nanocząstek przez organizację atomów (tzw. podejście *bottom-up*) lub metody wykorzystujące rozdrobnienie bądź mechaniczną obróbkę większych struktur (tzw. podejście *top-down*). Z ich pomocą możliwe jest otrzymanie zarówno nanomateriałów w postaci rozproszonej (na drodze syntezy chemicznej i kontrolowanego wzrostu), jak i w postaci zorganizowanych warstw, osadzanych bezpośrednio na

podłożach (na drodze kontrolowanego osadzania i metodami litograficznymi).

Podstawowy sposób klasyfikacji nanomateriałów bazuje na określeniu liczby ich wymiarów w nanoskali. Zgodnie z tym podziałem, nanomateriały klasyfikowane są do jednej z czterech zasadniczych grup (rys. 6.1):

- nanomateriały zerowymiarowe (0D) – ograniczone pod względem rozmiaru we wszystkich trzech kierunkach,
- nanomateriały jednowymiarowe (1D) – ograniczone rozmiarowo w dwóch kierunkach,
- nanomateriały jednowymiarowe (2D) – ograniczone rozmiarowo w jednym kierunku,
- nanomateriały trójwymiarowe (3D) – struktury, które jako całość nie spełniają definicji nanomateriału, ale w swojej strukturze zawierają elementy o wymiarach nanometrycznych. Wśród nich wyróżnić należy nanokompozyty dekorowane nanocząstkami oraz materiały hybrydowe złożone z nanometrycznych komponentów np. (struktury typu „nanogrzebień", czy „nanokwiat") [1].



RYS. 6.1

Podział nanomateriałów ze względu na wymiarowość: a) 0D, b) 1D c) 2D, d) 3D. Przedrukowano z [2]. Licencja: CC-BY 4.0

W dalszej części rozdziału przybliżone zostaną podstawowe typy nanomateriałów wszystkich wymienionych grup ze szczególnym uwzględnieniem tych właściwości, dzięki którym znajdują one zastosowanie w konstrukcji sensorów chemicznych i biosensorów.

6.1.1
Nanomateriały zerowymiarowe

Odkąd Norio Taniguchi wprowadził w 1974 roku pojęcie „nanotechnologii", jest obserwowany dynamiczny rozwój chemii materiałów o strukturze zerowymiarowej. Charakteryzują się one ultramałym rozmiarem pojedynczego kryształu, dużym stosunkiem powierzchni do objętości oraz unikatowymi właściwościami optycznymi, jak m.in. wysoka wydajność kwantowa fotoluminescencji. Do nanomateriałów zerowymiarowych są zaliczane zarówno sferyczne nanocząstki i nanosfery, jak i struktury anizotropowe o wydłużonych kształtach nanoprętów bądź nanorurek, których długość nie wykracza poza przyjętą wartość graniczną.

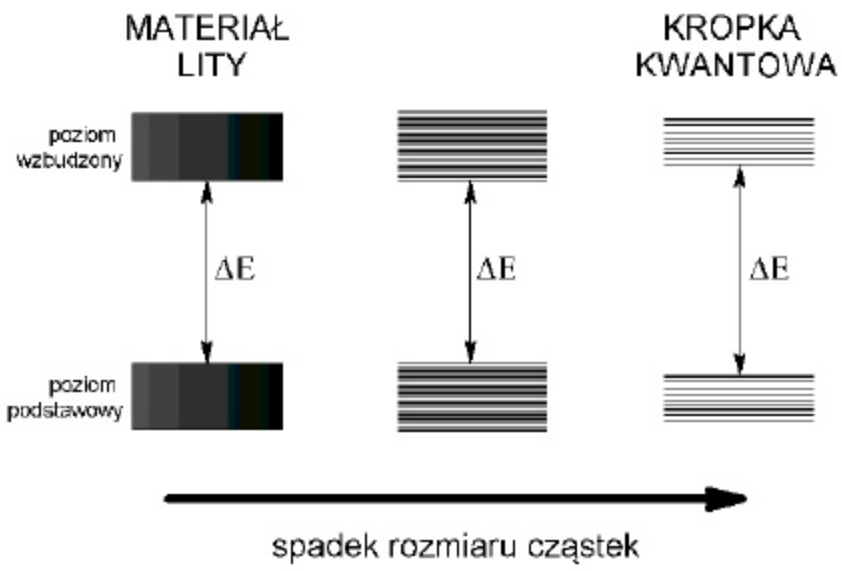
Nanocząstki mogą być zbudowane z różnorodnych funkcjonalnych materiałów, z których jednak historycznie największe znaczenie miały metale szlachetne. **Nanocząstki metaliczne**, głównie złota, platyny, palladu oraz w mniejszym stopniu srebra zachowują typową dla materiałów makroskopowych bierność w reakcjach tworzenia związków tlenowych, dzięki czemu mogą one przez długi czas zachować niezmienioną, metaliczną powierzchnię i doskonałe właściwości przewodzące. Nanocząstki metali

szlachetnych mają też cechy unikatowe i nieobserwowane dla ich odpowiedników w makroskali. Jedną z nich jest aktywność katalityczna typu heterogenicznego wobec niektórych reakcji utleniania-redukcji. Za to zjawisko jest odpowiedzialny wzrost nadmiarowych energii atomów, gdyż wraz ze zmniejszaniem średnic nanocząstek rośnie liczba niewysyconych centrów koordynacyjnych, zlokalizowanych na krawędziach, narożach i w defektach struktury krystalicznej. Swoista aktywność katalityczna i elektrokatalityczna nanomateriałów, wynikająca z dużej powierzchni, jest dość powszechnym zjawiskiem i obserwuje się ją również dla wszystkich kształtów nanostruktur. Jednak to nanocząstki metali szlachetnych cechuje największa zależność aktywności od ich rozmiaru.

Szczególną grupę pod względem właściwości optycznych stanowią tak zwane **nanocząstki plazmoniczne**. Zjawisko zlokalizowanego rezonansu plazmonów powierzchniowych, czyli kolektywnych drgań swobodnych elektronów przy powierzchni nanocząstki oddziałujących ze światłem widzialnym odpowiada za barwy nanocząstek zależne od ich rozmiaru i kształtu. Efekt LSPR jest szczególnie łatwo obserwowalny w przypadku nanocząstek złota i srebra. Dalsze ograniczanie wymiarów nanocząstek metali szlachetnych poniżej 2 nm skutkuje uzyskaniem struktur określanych jako **nanoklastery**. Składają się one z maksymalnie kilkudziesięciu atomów, przez co ich właściwości jeszcze silniej niż w przypadku nanocząstek są determinowane przez efekty kwantowe. Dzięki typowej dla pojedynczych atomów możliwości jednoelektronowych przejść energetycznych, nanoklastery są zdolne do emisji fluorescencji. Nanomateriały te wymagają bardzo starannie dobranej strategii stabilizacji zarówno na etapie syntezy, jak i po jej

zakończeniu. Tym niemniej, na przestrzeni ostatnich lat opracowano metody otrzymywania w środowisku wodnym nanoklasterów na bazie złota, srebra i miedzi.

Inną grupą nanocząstek o bardzo małych rozmiarach i wyraźnie obserwowanym wpływie efektów kwantowych są tzw. kropki kwantowe. Nanocząstki te są zbudowane z atomów grup 12. i 16. (np. kropki kwantowe ZnO, CdSe, CdTe), grup 13. i 15. (np. kropki kwantowe GaAs, InP), rzadziej chalkogenków ołowiu czy perowskitów. Tworzą one nanokryształy o rozmiarach w granicach od 1,5 do 10 nm i właściwościach półprzewodnikowych. Do kropek kwantowych są zaliczane też odkryte w 2004 roku kropki węglowe oraz cechujące się większymi rozmiarami (do 100 nm) kropki grafenowe [3]. Wspólną i jednocześnie najszerzej wykorzystywaną cechą kropek kwantowych jest zdolność do emisji fluorescencji o długości fali zależnej od rozmiaru nanocząstki. Za to zjawisko odpowiada efekt kwantowego uwięzienia elektronów w cząstkach o bardzo małym rozmiarze. Wraz ze spadkiem rozmiaru półprzewodnika, zwiększa się jego przerwa energetyczna, a co za tym idzie energia niezbędna do przejścia między poziomem podstawowym a wzbudzonym, co zilustrowano na rysunku 6.2.



RYS. 6.2

Schemat poziomów energetycznych półprzewodników makroskopowych i kropek kwantowych

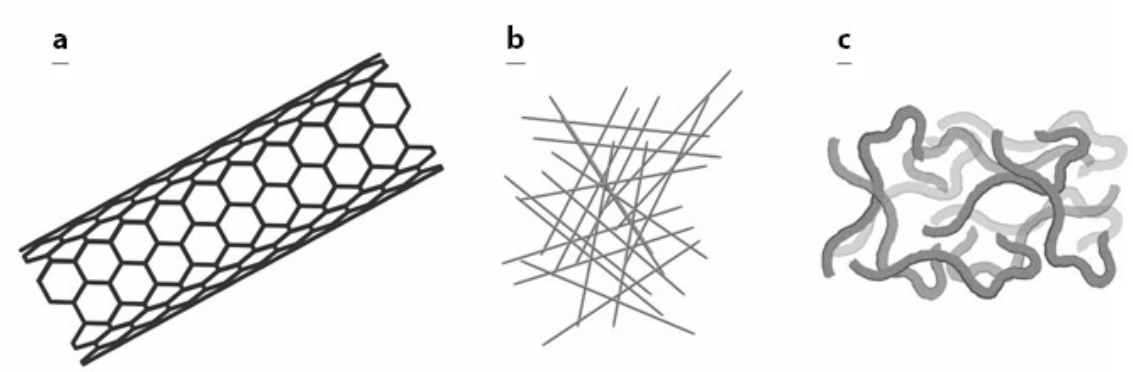
Wśród nanocząstek tlenkowych stosowanych w konstrukcji sensorów wyróżnić należy tzw. **nanocząstki magnetyczne** zbudowane z tlenku żelaza(II,III). Nanostrukturalny Fe_3O_4 o średnicy do około 50 nanometrów ma jedną domenę magnetyczną, przez co nanocząstka taka zyskuje właściwości superparamagnetyka. Pozwala to na kontrolę jej ruchu za pomocą przyłożonego, zewnętrznego pola magnetycznego.

Duża różnorodność dostępnych materiałów oraz ciągły rozwój metod syntezy zaowocował uzyskaniem wielu innych rodzajów nanocząstek, niezaliczających się do wyżej wymienionych grup. W konstrukcji sensorów stosuje się między innymi nanoczastki tlenków i chalkogenków metali przejściowych, nanocząstki ceramiczne (Al_2O_3, SiO_2, $Ca_3(PO_4)_2$), nanocząstki organiczne i zbudowane z polimerów (w tym polimerów przewodzących). W ich przypadku jednak, pożądane właściwości wynikają przede wszystkim

z cech użytego do ich budowy materiału. Jeszcze szerszą grupę stanowią różnorodne **nanocząstki mieszane**, na przykład nanoczastki domieszkowane, stopowe czy struktury typu rdzeń-powłoka. Odpowiednia metodyka i dobór składu pozwalają uzyskać nanocząstki łączące cechy użytych składników. Na przykład można łatwo zsyntezować nanoczastki wykazujące jednocześnie właściwości przewodzące (metaliczna powłoka) i magnetyczne bądź fluorescencyjne (rdzeń). Nierzadko, szczególnie w przypadku nanocząstek katalitycznych i półprzewodnikowych, możliwe jest również otrzymanie nanomateriałów hybrydowych o zupełnie nowych właściwościach.

6.1.2
Nanomateriały jednowymiarowe

Wspólną cechą nanomateriałów jednowymiarowych jest podłużny kształt. Materiały te mogą mieć teoretycznie nieograniczoną długość przy zachowaniu nanometrycznych wymiarów przekroju poprzecznego. Pod względem budowy wyróżnić można materiały „puste w środku", czyli nanorurki, materiały o przekroju poprzecznym zbliżonym do sferycznego (nanodruty i nanowłókna) oraz nanomateriały o wyraźnie niesferycznym przekroju poprzecznym określane jako nanopaski lub nanowstążki (rys. 6.3).



RYS. 6.3

Typowe morfologie nanomateriałów 1D: a) nanorurki, b) nanopręty, c) nanopaski

Jako jeden z najważniejszych przykładów materiałów o strukturze jednowymiarowej należy wskazać tzw. **nanorurki węglowe** (ang. *carbon nanotubes*, CNTs), stanowiące układ cylindryczny, składający się ze zwiniętych arkuszy atomów węgla o przeciętnej średnicy około 1,5 nanometra. Z uwagi na liczbę ścian, CNTs można sklasyfikować jako nanorurki jedno-, dwu- oraz wielościenne. Unikatowa struktura i morfologia materiałów z tej grupy sprawia, iż charakteryzują się one szeregiem interesujących właściwości elektrycznych, mechanicznych oraz termicznych. Do wiodących strategii otrzymywania CNTs zalicza się: chemiczne osadzanie z fazy gazowej (*chemical vapor deposition*, CVD), osadzanie techniką wyładowania łukowego (*arc-discharge deposition*) oraz ablację laserową. Prowadzone prace eksperymentalne i modelowanie teoretyczne wskazują, iż CNTs cechuje wysoka odporność na rozciąganie (powyżej 150 GPa), wysoki moduł Younga (ok. 1470 GPa) oraz satysfakcjonujące wartości przewodnictwa elektrycznego oraz termicznego (wynoszące odpowiednio ok. 107 $S \cdot m^{-1}$ i ok. 3500 $W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$). Dowiedziono, iż proszki nanorurek węglowych o dużym stopniu nieuporządkowania

i przypadkowej organizacji pojedynczych cząstek zwykle wykazują gorsze parametry mechaniczne i elektryczne, w porównaniu do struktur bardziej uporządkowanych. Efekt uporządkowania strukturalnego uzyskuje się w wyniku organizacji pojedynczych rurek w układy makroskopowe o morfologii jednowymiarowych włókien, dwuwymiarowych filmów oraz trójwymiarowych gąbek [4].

Włókna o strukturze jednowymiarowej są otrzymywane w wyniku przędzenia w fazie ciekłej. Z uwagi na silne oddziaływania występujące pomiędzy nanorurkami węglowymi, proces ten przebiega w obecności środków powierzchniowoczynnych. Należy jednak pamiętać, iż obecność surfaktantu w mieszaninie reakcyjnej wpływa na pogorszenie właściwości mechanicznych otrzymanej struktury i występowanie defektów w nanomateriale. Do otrzymywania ultracienkich dwuwymiarowych warstw CNTs prowadzą procesy bezpośredniego organizowania powierzchni, takie jak m.in. napylanie, filtracja próżniowa czy organizacja „warstwa po warstwie". Inną strategią jest osadzanie chemiczne z fazy gazowej. Materiały otrzymane w wyniku CVD charakteryzują się małym stopniem zdefektowania powierzchni, co przekłada się na ich doskonałe parametry mechaniczne. Jednakże metodę tę cechuje niska efektywność i skończona grubość otrzymywanego filmu. Trójwymiarowe gąbki CNT są efektem samoorganizacji połączonych struktur, otrzymywanych w wyniku chemicznego osadzania z fazy gazowej. Nanomateriał tego typu cechuje wysoka porowatość, rozwinięta powierzchnia właściwa, wysoka hydrofobowość oraz znaczna elastyczność, umożliwiająca łatwą i w pełni odwracalną zmianę kształtu struktury. W wypadku obserwowanych efektów, decydującą rolę odgrywa stopień zorganizowania struktury oraz

sposób połączenia nanorurek. Gąbki otrzymywane mogą być również w wyniku zastosowania metody hydrotermalnej.

W konstrukcji sensorów są przede wszystkim wykorzystywane unikatowe właściwości elektryczne nanorurek węglowych, które struktury te zawdzięczają hybrydyzacji sp^2 atomów węgla. W zależności od architektury i liczby ścian, nanorurki mogą wykazywać cechy półprzewodnika (nanorurki jednościenne – SWCNTs) lub przewodnika o charakterze metalicznym (nanorurki wielościenne – MWCNTs). Inną, ważną cechą nanorurek węglowych jest duża i zróżnicowana chemicznie powierzchnia. Zarówno końce nanorurek, jak i ich powierzchnia boczna stanowią dogodną platformę do funkcjonalizacji, odpowiednio z wykorzystaniem wiązań kowalencyjnych oraz oddziaływań typu *π-π*.

Pod pojęciem **nanowłókien** kryje się szeroka gama materiałów o zróżnicowanym kształcie i sferycznym przekroju. Struktury takie cechuje silnie rozwinięta powierzchnia – tym większa, im mniejsza jest przeciętna średnica pojedynczej struktury. Łatwość otrzymywania porowatych mat nanowłókien na drodze elektroprzędzenia zaowocowała uzyskaniem włókien polimerowych i kompozytowych o różnej morfologii, w tym porowatych i warstwowych. Innymi metodami możliwe jest również uzyskanie nanowłókien nieorganicznych, w tym ceramicznych, węglowych i zbudowanych z tlenków metali.

Ważną grupą nanomateriałów 1D są uzyskiwane głównie z materiałów nieorganicznych **nanodruty**. Dzięki nanometrycznym przekrojom, duży wpływ na ich właściwości elektryczne ma kwantowy efekt rozmiaru, jak również lokalne środowisko przy ich powierzchni. Największe znaczenie mają obecnie nanodruty

metaliczne (Ag, Au), półprzewodnikowe (Si, GaN) i magnetyczne (Co, Ni), tym niemniej możliwe jest ich formowanie z izolatorów oraz nadprzewodników.

6.1.3
Nanomateriały dwuwymiarowe

Do obserwowanego w ostatnich latach wzrostu zainteresowania materiałami dwuwymiarowymi przyczyniło się przyznanie w 2004 roku nagrody Nobla za syntezę i opis właściwości grafenu. Dowiedziono wówczas, iż otrzymany materiał ma właściwości, które do tamtego czasu były jedynie przedmiotem spekulacji i założeń teoretycznych, m.in.: wysokie przewodnictwo elektryczne i cieplne, niewielka rezystywność oraz wysoka wytrzymałość mechaniczna. Nanomateriały 2D przyjmują postać cienkich warstw o teoretycznie nieograniczonej powierzchni i grubości nieprzekraczającej kilku warstw atomowych. Struktury nanopłatków, nanokartek czy nanodysków charakteryzują się największym spośród wszystkich nanomateriałów stosunkiem powierzchni do objętości. W skrajnym przypadku warstw jednoatomowych wszystkie atomy znajdują się na powierzchni. Z uwagi na występowanie oddziaływań van der Waalsa pomiędzy sąsiadującymi cząstkami, obecnie znane nanomateriały dwuwymiarowe wykazują jednak tendencję do tworzenia struktur wyższego rzędu. Materiały 2D są silnie anizotropowe, co znaczy, że ich właściwości fizyczne różnią się w zależności od rozpatrywanego wymiaru.

Grafen jako półprzewodnik z zerową przerwą energetyczną wykazuje cechy pośrednie względem zarówno metali, jak i klasycznych półprzewodników. Dodatkowo – podobnie, jak w przypadku struktur 1D – właściwości elektryczne grafenu cechuje wrażliwość na lokalne środowisko. Materiał ten wyróżnia się na tle pozostałych z uwagi na bardzo wysoką ruchliwość elektronów (rzędu 5000 $cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$) i doskonałe przewodnictwo [5]. Niepoddany modyfikacji grafen jako materiał składający się jedynie z atomów węgla jest zaliczany do grupy materiałów 2D o strukturze jednoatomowej. Jako inny przykład materiału 2D o strukturze jednoatomowej można wskazać m.in. krystaliczny krzem. Do poliatomowych materiałów zalicza się azotek boru, o cechach morfologicznych zbliżonych do struktury grafenu.

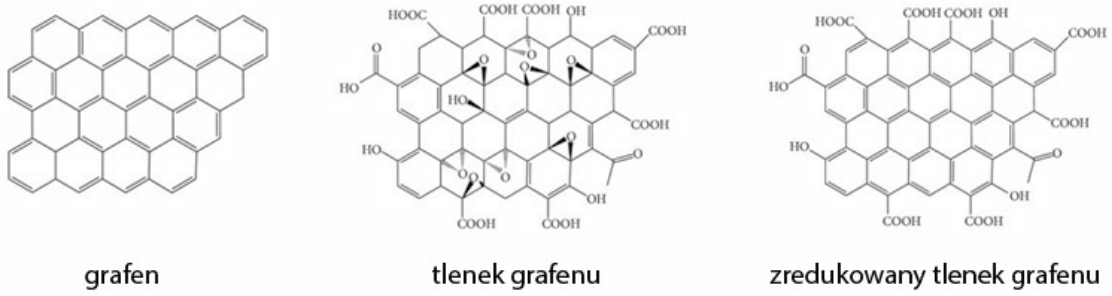
Obok grafenu i jego pochodnych, będących najlepiej jak dotąd poznanymi strukturami dwuwymiarowymi, otrzymano wiele innych materiałów 2D. Przykład kryształu dwuwymiarowego stanowi heksagonalny azotek bromu (hBN), który znalazł zastosowanie w elektronice grafenowej. Badania nad półprzewodnikowymi warstwami 2D dostarczyły dowodów na to, że ich struktura i właściwości zmieniają się podczas przekształcenia ich w monowarstwy. Półprzewodnikowe materiały 2D, określane jako dichalkogenki metali przejściowych (TMDC) do dziś są przedmiotem zainteresowania badawczego. Poza wymienionymi wyżej, istnieją liczne grupy materiałów warstwowych, do których należą między innymi monochalkogenki (np. GaSe – selenek galu) i jednoelementowe półprzewodniki (np. fosforen) [6].

Ostatnie lata przyniosły rosnące zainteresowanie nową grupą interesujących materiałów 2D, czyli tzw. **fazami *MXenes***. Są to

warstwowe azotki, węgliki, a także węglikoazotki metali przejściowych. Struktura MXenes składa się z naprzemiennych warstw metalu przejściowego oraz azotu lub węgla. MXenes charakteryzują się właściwościami pośrednimi między materiałami ceramicznymi a metalami. Do otrzymywania struktur MXenes prowadzi proces złuszczania warstwy atomowej A (zwykle glinu lub galu) obecnej w strukturze trójwymiarowego materiału prekursorowego, tj. tzw. fazy MAX. Proces złuszczania następuje w wyniku wspomaganej ultradźwiękami eksfoliacji w środowisku kwasu fluorowodorowego. Prowadzi to do otrzymywania trójwymiarowych struktur MXenes, które następnie są poddawane procesowi dalszego złuszczania, w efekcie czego otrzymywana jest frakcja dwuwymiarowych nanopłatków. Substratami do otrzymywania MXenes są stałe fazy MAX, do których zalicza się azotki oraz węgliki. Ich wzór chemiczny można przedstawić jako $M_{n+1}AX_n$, gdzie n = 1, 2 lub 3, M oznacza atom metalu przejściowego (Sc, Ti, Zr, Hf, V, Nb, Ta, Cr, lub Mo), A oznacza pierwiastek grupy 13., 14. lub 15. (Al, Ga, In, Tl, Si, Ge, Sn, Pb, P, As, Bi, S, lub Te), natomiast X to węgiel lub azot. MXenes stanowią najbliższe pod względem struktury i właściwości analogi grafenu. Wykazują one zbliżone właściwości elektryczne do właściwości grafenu, choć nieco gorsze niż grafen, jednak ich przewagą jest większa prostota i powtarzalność metod otrzymywania. Duże znaczenie ma również fakt, że w przeciwieństwie do grafenu, materiały te wykazują charakter hydrofilowy dzięki obecności polarnych grup funkcyjnych na krawędziach nanopłatków.

W zastosowaniach bioanalitycznych dużą popularnością cieszą się również pochodne grafenu: tlenek grafenu (GO) i zredukowany

tlenek grafenu (rGO) (rys. 6. 4). Dzięki obecności różnego typu grup tlenowych (m.in. –OH, –C=O i –COOH) tlenek grafenu jest zdolny do tworzenia stabilnych zawiesin w roztworach wodnych oraz wykazuje zdolność do emisji fluorescencji. Z kolei płatkowy rGO z uwagi na niski koszt i prostotę otrzymywania (na drodze redukcji tlenku grafenu otrzymywanego z grafitu) stanowi w wielu zastosowaniach wartościową alternatywę dla wciąż relatywnie drogiego grafenu.



RYS. 6.4

Struktury grafenu i jego pochodnych. Przedrukowano z [7]. Licencja: CC-BY 3.0

6.2
Warstwy receptorowe sensorów i biosensorów oparte na

nanomateriałach

Marcin DROZD

W przypadku klasycznych sensorów i biosensorów mających makroskopowy przetwornik, będący jednocześnie podłożem dla unieruchomionej warstwy receptorowej, wyróżnia się dwie zasadnicze strategie wykorzystania nanomateriałów. W pierwszej z nich, już na etapie wytwarzania sensora, warstwy nanomateriałów są wprowadzane na powierzchnie przetworników lub warstw łączących część receptorową i przetwornikową. W drugiej koncepcji nanomateriały (najczęściej powierzchniowo funkcjonalizowane receptorami) pełnią funkcję znaczników – komponentów warstwy receptorowej. Znaczniki takie, w zależności od mechanizmu detekcji, wiążą się z powierzchnią sensora, odłączają się od niej bądź zmieniają organizację na powierzchni na skutek specyficznego wiązania analitu. Obecność znaczników w warstwie receptorowej pozwala na wygenerowanie w sposób bezpośredni lub pośredni sygnału chemicznego, zależnego od stężenia oznaczanej substancji w próbce. W rozdziale zostaną przedstawione przykłady zastosowań nanomateriałów w najczęściej stosowanych systemach detekcji.

6.2.1 Zastosowanie nanomateriałów

Nanomateriały jako komponenty przetworników sensorów elektrochemicznych

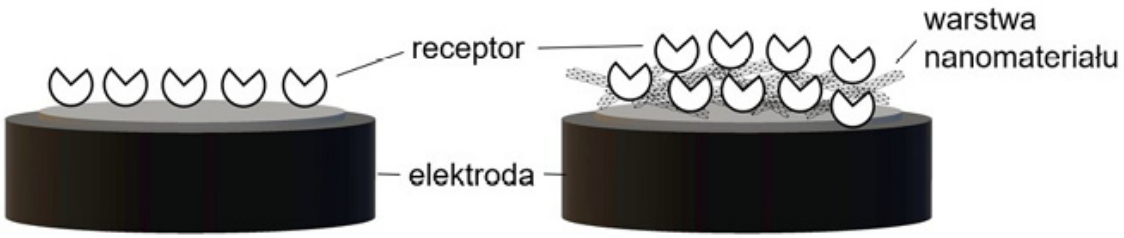
Podstawową strategią wykorzystania nanomateriałów **w sensorach amperometrycznych i woltamperometrycznych** jest ich wprowadzenie do **warstw pośrednich i przetwornikowych elektrod modyfikowanych**. W przypadku sensorów bazujących na specyficznym oddziaływaniu receptor–analit i biosensorów powinowactwa, bezpośrednim lub pośrednim źródłem sygnału prądowego jest na ogół adsorpcja cząsteczek analitu na powierzchni modyfikowanej elektrody. To właśnie powierzchniowy charakter zjawisk będących źródłem informacji chemicznej sprawia, że jednym z głównych kierunków rozwoju sensorów (wolt)amperometrycznych jest właśnie wykorzystanie nanomateriałów jako warstw przejściowych lub samodzielnych powierzchni przetworników. Wprowadzenie nanomateriałów lub kompozytów o właściwościach przewodzących lub elektrokatalitycznych do takiej warstwy pozwala na osiągnięcie kilku zasadniczych celów, którymi są:

- rozwinięcie powierzchni elektrody – duża powierzchnia właściwa nanomateriałów skutkuje wielokrotnym zwiększeniem powierzchni aktywnej elektrochemicznie, przy jednoczesnym

zachowaniu makroskopowego wymiaru elektrody. Trójwymiarowa nanoarchitektura elektrody umożliwia immobilizację większej ilości receptorów na powierzchni w porównaniu do klasycznych przetworników, co przekłada się na czułość sensora (rys. 6.5). Taka powierzchnia sprzyja również wydajniejszemu transportowi masy, a tym samym skraca czas odpowiedzi sensora.

- lepszy kontakt elektryczny pomiędzy powierzchnią przetwornika a cząsteczkami elektroaktywnymi – nanomateriały o właściwościach przewodzących i dużej ruchliwości nośników ładunku wpływają na poprawę przewodnictwa i kinetyki przeniesienia elektronów. Przekłada się to na wzrost wartości rejestrowanych prądów, a tym samym poprawę stosunku sygnału do szumu.
- ułatwienie immobilizacji receptorów – poza efektem rozwinięcia powierzchni, dobór odpowiedniego nanomateriału jako warstwy pośredniej może ułatwić bezpośrednią adsorpcję lub chemisorpcję receptorów, bądź ich dowiązanie poprzez grupy funkcyjne nanomateriału (np. grupy karboksylowe lub aminowe).
- wykorzystanie procesów elektrokatalitycznych – niektóre nanomateriały (np. nanocząstki błękitu pruskiego) dzięki swoistej aktywności w reakcjach utleniania-redukcji mogą modulować procesy zachodzące na powierzchni elektrody. Obniżenie potencjału niezbędnego do uzyskania pożądanej odpowiedzi prądowej od analitu lub markera redoks wpływa na poprawę selektywności.
- użycie nanomateriałów i ich kompozytów jako samodzielnych, cienkowarstwowych przetworników – warstwy nanomateriałów mogą być nanoszone na podłoża nieprzewodzące metodami

bottom-up lub przez osadzanie z fazy ciekłej lub gazowej. Otwiera to możliwość wytwarzania elektrod o dowolnej geometrii na różnorodnych podłożach (np. elastycznych czy rozciągliwych).



RYS. 6.5

Schemat sensora elektrochemicznego z warstwą receptorową immobilizowaną na płaskiej elektrodzie (po lewej) i elektrodzie pokrytej nanomateriałem (po prawej)

Do modyfikacji przetworników sensorów i biosensorów woltamperometrycznych jest stosowana bardzo szeroka gama nanomateriałów o zróżnicowanym składzie i strukturze. Są to zarówno nanocząstki metaliczne (m. in. nanocząstki złota, srebra, palladu i platyny), nanomateriały jednowymiarowe w postaci wielościennych nanorurek węglowych i nanowłókien zbudowanych z metali i polimerów przewodzących (np. polianiliny) oraz nanomateriały dwuwymiarowe, takie jak grafen czy dichalkogenki metali przejściowych, np. MoS_2. Dalszą poprawę parametrów sensorów można uzyskać dzięki zastosowaniu nanokompozytów oraz nanomateriałów hybrydowych, np. nanocząstek bimetalicznych czy szkieletów nanopłatków i nanowłókien dodatkowo dekorowanych nanocząstkami metali [8].

Warstwy nowych typów nanomateriałów w konstrukcji sensorów elektrochemicznych stanowią aktualnie obiekt dużego zainteresowania badaczy. Dzieje się tak przede wszystkim z racji

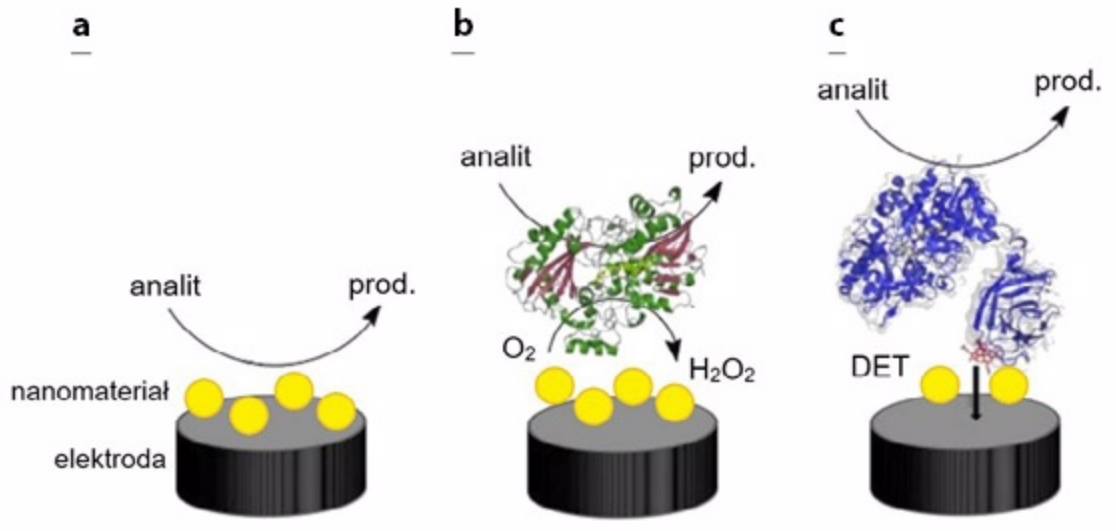
możliwości opracowania sensorów charakteryzujących się bardzo niskimi granicami detekcji bioanalitów, na poziomie stężeń często poniżej 1 nM oraz ciągłego rozwoju wiedzy o nowych typach nanomateriałów przewodzących i elektroaktywnych. Poprawa parametrów analitycznych tak modyfikowanych elektrod pociąga za sobą jednak większe skomplikowanie i wydłużenie procesu wytwarzania takich sensorów. Istotne wyzwanie z punktu widzenia zastosowań komercyjnych stanowi również konieczność opracowania metodyk powtarzalnego nanoszenia warstw nanomateriałów.

Ważną grupę bioanalitów oznaczanych za pomocą **elektrochemicznych sensorów** stanowią związki, będące jednocześnie substratami w reakcjach **katalitycznych i/lub enzymatycznych**. Celem wykrycia takiej substancji, w warstwach receptorowych wykorzystuje się odpowiednio dobrany, selektywny katalizator lub biokatalizator (enzym), przekształcający analit w łatwo mierzalny produkt. Wśród związków możliwych do oznaczenia w ten sposób wyróżnić należy przede wszystkim glukozę, ale również kwas mlekowy, cholesterol czy ksantynę. Z kolei rolę bezpośrednio oznaczanego produktu reakcji katalizowanej przez enzym (w tym przypadku oksydazę) odgrywa najczęściej nadtlenek wodoru [9].

Wiele nanomateriałów wykazuje swoistą aktywność katalityczną, naśladującą aktywność natywnych enzymów. Znajdują one zastosowanie jako zasadnicze komponenty warstw receptorowych, stanowiąc alternatywę dla izolowanych enzymów (rys. 6.6a). Z uwagi na fakt, iż nanomateriały wykazują aktywność przede wszystkim względem katalizy reakcji utleniania-redukcji, do konstrukcji tego typu sensorów z powodzeniem stosuje się detekcję

(wolt)amperometryczną. Zastosowanie nanomateriału katalitycznego zamiast natywnego enzymu znacząco poprawia trwałość sensora z uwagi na wyeliminowanie wrażliwego i podatnego na inaktywację receptora biologicznego. Z reguły odbywa się to jednak kosztem zmniejszenia selektywności. Dobry przykład mogą stanowić intensywnie rozwijające się w ostatnich latach nieenzymatyczne sensory glukozy. Jako warstwy receptorowe o funkcjonalności oksydazy glukozowej mogą być m.in. stosowane nanocząstki platyny tworzące strukturę nanoporowatej elektrody lub umieszczane w postaci cienkiej warstwy na powierzchni klasycznego przetwornika nanodruty mono- i bimetaliczne (np. Au/Pt) czy nanomateriały węglowe dekorowane nanocząstkami (np. GO-AuNPs, czy MWCNT-PtNPs). Nieenzymatyczne sensory glukozy oparte na nanomateriałach katalitycznych, poza bardzo wysoką trwałością, wykazują czułość wystarczającą do podstawowych zastosowań bioanalitycznych (np. granice detekcji glukozy poniżej 100 μM). Do istotnych ograniczeń tego typu sensorów należy zaliczyć podatność na interferencje ze strony innych składników elektroaktywnych oraz adsorpcję składników próbki na powierzchni katalizatora. Niemniej istotnym ograniczeniem jest fakt, iż optimum aktywności większości nanocząstek katalitycznych stanowią media o odczynie zasadowym, co znacząco utrudnia ich bezpośrednie stosowanie w próbkach biologicznych. Próby rozwiązania tych problemów, m.in. poprzez wprowadzenie dodatkowych warstw chroniących powierzchnię i poprawiających selektywność (np. Nafion™) czy opracowanie nanomateriałów aktywnych katalitycznie w pH fizjologicznym stanowią obecnie główne kierunki rozwoju tego typu sensorów.

Oprócz pełnego zastąpienia enzymu w warstwie receptorowej, nanomateriały są również stosowane jako komponent warstwy równolegle z enzymami, wspomagając ich aktywność lub komunikację z powierzchnią elektrody. Nanocząstki metali szlachetnych, dzięki niewielkim rozmiarom i właściwościom przewodzącym znajdują zastosowanie w biosensorach wszystkich generacji, odgrywając różne role: od aktywnego elektrokatalitycznie materiału elektrodowego stanowiącego jednocześnie platformę do immobilizacji enzymu (AuNPs, PtNPs, PdNPs, materiały węglowe i ich kompozyty) w biosensorach pierwszej generacji (rys. 6.6b), poprzez komponent mediatorów (tlenek grafenu, nanoklastery Au) w biosensorach drugiej generacji, aż po zastosowanie przewodzących nanostruktur metalicznych lub węglowych jako „molekularne przewody", umożliwiające bezpośredni transfer elektronów (ang. *direct electron transfer*, DET) pomiędzy centrum aktywnym enzymu a przetwornikiem (rys. 6.6c).



RYS. 6.6

Przykłady zastosowań nanomateriałów w katalitycznych sensorach

elektrochemicznych: a) sensor nieenzymatyczny – nanomateriał jako katalizator–mimetyk enzymu, b) nanomateriał jako elektrokatalityczne podłoże do immobilizacji enzymu, c) nanomateriał jako molekularny przewód, umożliwiający bezpośrednie przeniesienie elektronów (DET). Zaadaptowano z [9]. Licencja: CC-BY 4.0

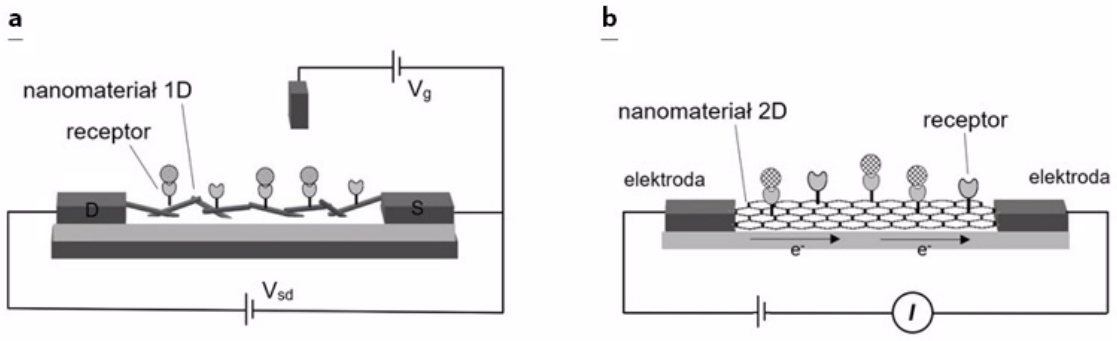
Nanomateriały znajdują zastosowanie zarówno jako elementy przetwornikowe i komponenty warstw receptorowych **sensorów potencjometrycznych**. W nowoczesnych czujnikach potencjometrycznych pozbawionych elektrolitu wewnętrznego są wykorzystywane warstwy nanomateriałów wykazujące cechy przewodnictwa jonowo-elektronowego. Są one złożone z nanocząstek metalicznych, materiałów węglowych czy przewodzących nanostruktur polimerowych i funkcjonują jako przetworniki (tzw. stały kontakt) pomiędzy elektrodą a membraną jonoselektywną. Nanocząstki metaliczne są też stosowane jako dodatki mające na celu zmniejszenie oporności i tym samym poprawę parametrów pracy membrany jonoselektywnej. Jeszcze dalej idącym rozwiązaniem jest zastosowanie warstw złożonych z nanomateriałów (m.in. grafenu czy nanocząstek złota) powierzchniowo modyfikowanych ligandami kompleksującymi o funkcjonalności jonoforów. Takie warstwy, dzięki rozwiniętej powierzchni i zdolności do generowania sygnału potencjometrycznego w kontakcie z roztworem oznaczanej substancji, stanowią alternatywę dla typowo stosowanych membran polimerowych [10].

Właściwości półprzewodnikowe materiałów jednowymiarowych i dwuwymiarowych, wśród których wyróżnić należy nanopręty i nanowłókna krzemowe i z tlenków metali, jednościenne nanorurki węglowe oraz nanopłatki grafenu, pozwoliły na ich wykorzystanie

w konstrukcji **sensorów na bazie tranzystorów polowych**. Podobnie jak w klasycznych sensorach ISFET czy CHEMFET, warstwa receptorowa znajduje się na odsłoniętej warstwie dielektryka bramkowego. Wprowadzona na powierzchnię bardzo cienka warstwa nanomateriału półprzewodnika stanowi chemicznie czuły kanał łączący źródło i dren, jednocześnie stanowiąc platformę dla dalszej funkcjonalizacji. Pozostająca w kontakcie z badaną próbką warstwa receptorowa na skutek przyłączenia naładowanych cząsteczek analitu zmienia swój potencjał powierzchniowy, co w rezultacie przesuwa napięcie progowe tranzystora (rys. 6.7a).

Dzięki zastosowaniu nanometrycznej grubości kanałów, wpływ lokalnych zmian potencjału przy powierzchni na ich przewodnictwo jest większy niż w przypadku klasycznych układów CHEMFET. Nanomateriały stosowane w roli kanałów, dzięki niewielkim średnicom (porównywalnym do przeciętnego promienia Debye'a w badanej próbce) i znacznym długościom (gwarantującym efektywne połączenie źródła i drenu) zapewniają podwyższoną czułość sensora na zmiany właściwości elektrycznych powierzchni wynikające z asocjacji cząsteczek analitu. Co warte podkreślenia, wykorzystanie nanomateriałów w kanałach biosensorów FET otwiera możliwość dalszej miniaturyzacji pozostałych komponentów wchodzących w skład sensora, m.in. samych elektrod czy wyprowadzeń elektrycznych. Z uwagi na szeroką pulę potencjalnych analitów (jony i cząsteczki obdarzone ładunkiem w warunkach pomiaru), w roli receptorów sensorów na bazie tranzystorów polowych są wykorzystywane zarówno receptory molekularne, jak i bioreceptory, takie jak enzymy, przeciwciała czy sekwencje DNA [11].

Nanomateriały anizotropowe 1D i 2D o właściwościach przewodzących stanowią również kluczowe komponenty nowoczesnych sensorów i biosensorów opornościowych (**chemirezystorów**). Ich konstrukcja typowo składa się z dwóch elektrod połączonych materiałem chemorezystywnym pełniącym funkcję przetwornika osadzonego na izolującym podłożu (rys. 6.7b). W przeciwieństwie do klasycznych sensorów wykorzystujących metaliczne warstwy receptorowe, warstwa przewodnika powierzchniowego o nanometrycznej grubości (w postaci nanodrutów i nanowłókien tlenków metali, polimerów przewodzących, nanorurek i nanopłatków grafenu lub ich kompozytów) daje dużo większe możliwości modyfikacji chemicznej czułości chemirezystora. Dzięki temu, że zarówno materiały 1D, jak i 2D oferują znaczną powierzchnię boczną, możliwa jest ich funkcjonalizacja chemiczna oraz przyłączanie bioreceptorów (enzymów, przeciwciał czy DNA). Względnie duże zmiany przewodności na skutek oddziaływania analitu z warstwą receptorową wynikają z faktu, iż przepływ prądu przez nanometryczny przetwornik odbywa się w bezpośredniej bliskości powierzchni.



RYS. 6.7

Przykładowe schematy sensorów powinowactwa wykorzystujących materiały 1D i 2D: a) CHEMFET, b) chemirezystor

Istotnym ograniczeniem obu grup sensorów w analizie próbek ciekłych jest niemożność realizowania pomiarów w próbkach o wysokiej sile jonowej. Duża przewodność próbki prowadzi do ekranowania ładunku i wpływa na pogorszenie się stosunku sygnału do szumu. Tym samym pogorszeniu ulegają podstawowe parametry analityczne sensora, czyli czułość i dolna granica detekcji. Zastosowanie nanomateriałów otwiera jednak pewne możliwości minimalizacji negatywnych efektów tła. Dzięki łatwości powierzchniowej funkcjonalizacji nanostrukturalnego przetwornika, możliwe jest zaprojektowanie warstwy receptorowej w taki sposób, aby uzyskać jednocześnie dużą gęstość powierzchniową receptorów i niewielki dystans pomiędzy miejscem wiążącym receptora a powierzchnią nanomateriału [11].

Poza zastosowaniami w warstwach receptorowych i na powierzchni przetworników, **nanomateriały** znajdują zastosowanie jako **komponenty innych części sensorów elektrochemicznych**. Domieszki nanomateriałów przewodzących, takich jak grafen czy wielościenne nanorurki węglowe oraz nanocząstki i nanowłókna metali (przede wszystkim srebra i złota), wchodzą w skład past do sitodruku oraz atramentów do druku strumieniowego i aerozolowego struktur elektrycznych, pozwalając na bezpośrednie drukowanie kontaktów i wyprowadzeń elektrod. Przewagą wykorzystania nanomateriałów we wszelkiego rodzaju ścieżkach przewodzących jest z jednej strony łatwość automatycznego i precyzyjnego nanoszenia cienkich warstw za

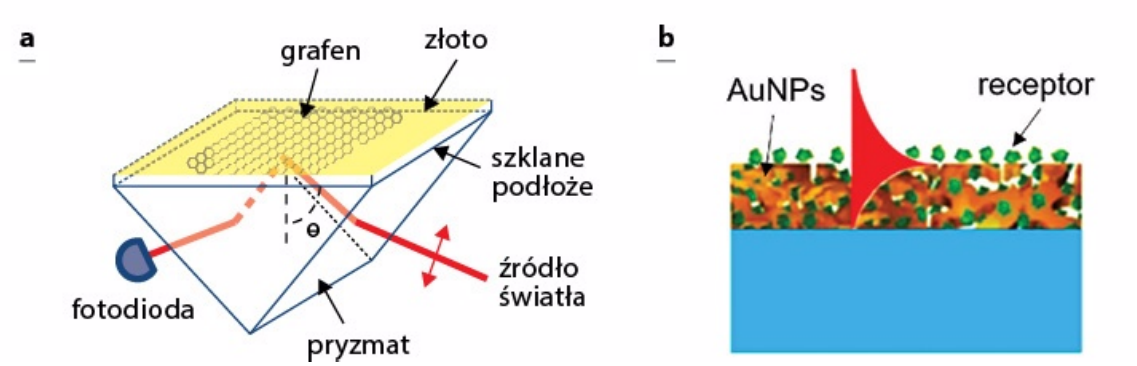
pomocą technik drukarskich, a z drugiej strony zwiększona odporność mechaniczna i rozciągliwość, przy zachowaniu zdolności do przewodzenia prądu [12].

Nanomateriały jako komponenty przetworników sensorów optycznych

Sterowane kształtem i rozmiarem właściwości optyczne nanocząstek czynią je atrakcyjnym materiałem w konstrukcji sensorów optycznych. W większości zastosowań sensorowych wykorzystuje się nanoczastki koloidalne, niezwiązane z makroskopowym przetwornikiem optycznym. Istnieją jednak przykłady nanomateriałów, których zdolność oddziaływania z promieniowaniem elektromagnetycznym wykorzystano poprzez umieszczenie ich w postaci warstw na powierzchni przetwornika. Zaliczają się do nich m.in. plazmoniczne nanocząstki złota i grafen.

Wspólną cechą sensorów bazujących na zjawisku **rezonansu plazmonów powierzchniowych** (SPR) jest wykorzystanie cienkiej warstwy metalu umożliwiającego wzbudzenie oscylacji swobodnych elektronów. Pomimo relatywnie krótkiego zasięgu powstającej fali zanikającej (do około 100 nm od granicy złoto–ośrodek), w konstrukcji sensorów SPR jest możliwe wykorzystanie nanomateriałów jako dodatkowych warstw pośrednich. Idealnym materiałem do tworzenia cienkich warstw jest grafen. Materiał ten, z uwagi na wysoką wartość składowej stałej dielektrycznej, skutecznie absorbuje promieniowanie padające na przetwornik, przez co możliwe jest wzmocnienie powstającej w wyniku zjawiska

SPR fali zanikającej (rys. 6.8a). Obserwowane jest to jako większy spadek intensywności promieniowania odbitego dla kąta rezonansowego, co przekłada się na większą czułość sensora. Ponadto grafen otwiera możliwości zastosowania nowych strategii immobilizacji warstwy receptorowej, np. poprzez wykorzystanie oddziaływań typu *π-π*. Jednocześnie warstwa grafenu pasywująca powierzchnię przetwornika stanowi dodatkowe zabezpieczenie przed niepożądaną adsorpcją niespecyficzną składników próbki [13]. Innym sposobem zwiększenia czułości sensorów SPR jest wprowadzenie na powierzchnię klasycznego przetwornika warstwy nanocząstek złota. Za poprawę parametrów analitycznych sensora odpowiada w tym przypadku rozwinięcie powierzchni przetwornika, a tym samym zwiększenie gęstości powierzchniowej immobilizowanych receptorów (rys. 6.8b). Strategie wykorzystujące nanomateriały do amplifikacji sygnału w sensorach SPR znajdują zastosowanie przede wszystkim w przypadku detekcji małych cząsteczek organicznych, których wiązanie z receptorem generuje stosunkowo małą odpowiedź sensora. Rozwinięcie powierzchni poprzez zastosowanie nanoporowatego złota w miejsce płaskiego przetwornika pozwala na nawet kilkudziesięciokrotny przyrost czułości oznaczenia małych cząsteczek organicznych, otwierając tym samym możliwość detekcji na poziomie poniżej 1 nM bez stosowania znaczników [14].

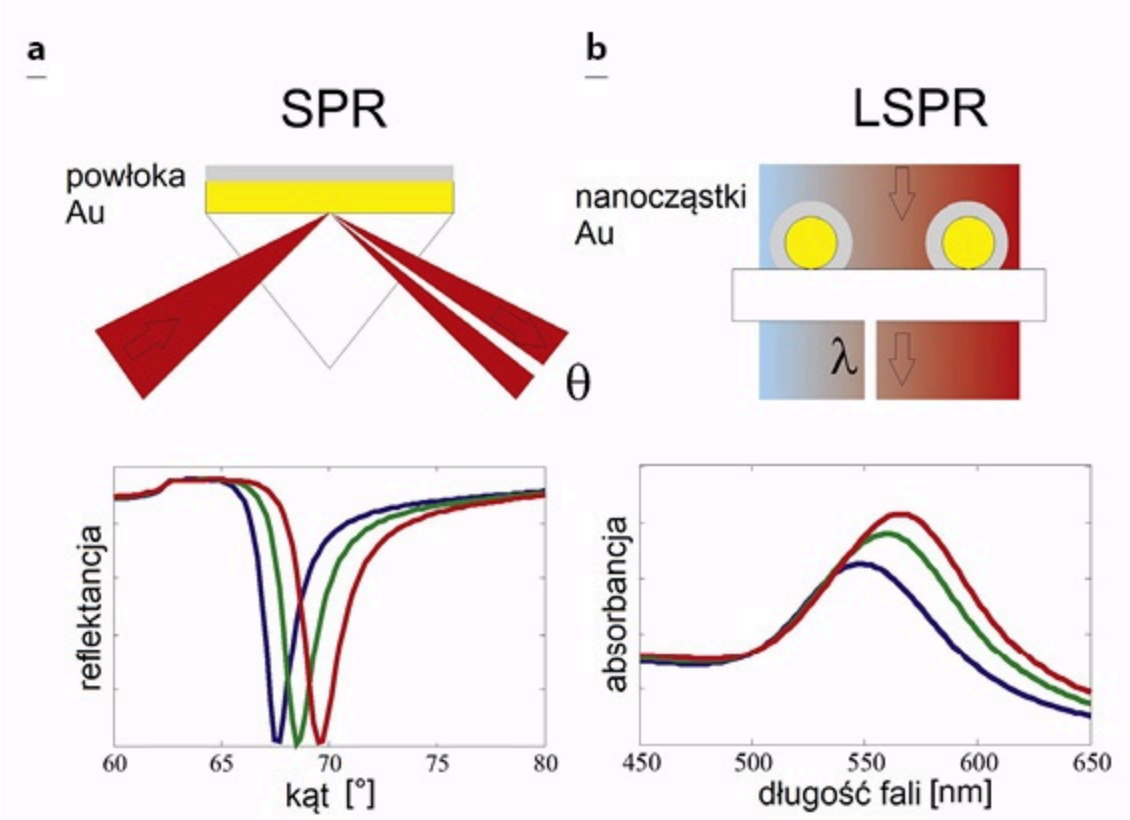


RYS. 6.8

Strategie wzmocnienia sygnału SPR wykorzystujące warstwy nanomateriałów: a) grafen, b) nanocząstki złota [13, 14]. Przedrukowano za zgodą: a) © 2012 AIP Publishing, b) licencja CC-BY 4.0

Rozwój metod syntezy nanocząstek o właściwościach optycznych silnie zależnych od zmian lokalnego środowiska przy ich powierzchni zaowocował w ostatnim dziesięcioleciu wykształceniem nowej grupy sensorów wykorzystujących **zjawisko zlokalizowanego rezonansu plazmonów powierzchniowych** (*localized surface plasmon resonance*, LSPR) na powierzchni nanocząstek metalicznych. Fizykochemiczne podstawy generowania sygnału sensorów LSPR są identyczne jak w przypadku klasycznych układów SPR, jednakże oba typy sensorów różnią się pod względem zarówno stosowanych przetworników, jak i samego mechanizmu detekcji. Typowy przetwornik LSPR składa się ze szklanego podłoża pokrytego cienką warstwą nanocząstek plazmonicznych. Najczęściej są stosowane anizotropowe nanocząstki złota wykazujące wąskie i silne pasmo absorpcji, tak jak nanopręty, nanodyski czy nanopryzmaty. Nanocząstki pełnią więc funkcję platformy do immobilizacji receptorów, jak również są odpowiedzialne za generowanie sygnału optycznego (rys. 6.9).

Warstwa nanocząstek unieruchomionych na szklanym podłożu pozwala na rejestrację ich widma absorpcji w trybie transmisyjnym. Związanie analitu przez receptor zaimmobilizowany na powierzchni nanocząstek i związana z tym zmiana lokalnego współczynnika załamania światła przekłada się na proporcjonalne przesunięcie maksimum absorpcji nanocząstek. Niewątpliwą przewagą LSPR w kontekście miniaturyzacji i zastosowań komercyjnych jest tryb odczytu oparty na prostym pomiarze absorbancji (rejestracja widma lub zmian wartości absorbancji przy stałej, odpowiednio dobranej długości fali). Nie wymaga to skomplikowanego układu optycznego, jak ma to miejsce w klasycznej detekcji SPR bazującej na całkowitym wewnętrznym odbiciu. Ograniczeniem techniki LSPR jest bardzo krótki zasięg oddziaływania (rzędu 30 nm), jeszcze mniejszy niż w przypadku płaskich przetworników SPR. Skutkuje to zarówno zawężeniem puli analitów do związków o relatywnie dużej masie cząsteczkowej, jak i ograniczoną możliwością rozbudowy architektury powierzchni poprzez stosowanie dodatkowych warstw, z uwagi na konieczność zachowania niewielkiej odległości receptora od nanocząstki.



RYS. 6.9

Zasada działania sensorów SPR: a) klasyczny sensor SPR z warstewką złota (układ odbiciowy), b) sensor LSPR z nanostrukturami złota (układ transmisyjny). Zaadaptowano z [15]. Licencja CC-BY 4.0

Nanostrukturalne podłoża są stosowane w konstrukcji sensorów optycznych z detekcją opartą o **powierzchniowo wzmocnioną spektroskopię Ramana** (*surface-enhanced Raman spectroscopy*, SERS). Technika ta wykorzystuje zjawisko generowania intensywnego sygnału ramanowskiego (wzmocnienie rzędu 10^6 względem standardowego widma) przez cząsteczki zaadsorbowane na chropowatych powierzchniach niektórych metali, takich jak złoto, srebro czy miedź. Przyjmuje się, że wzmocnienie sygnału jest wypadkową dwóch mechanizmów, z których dominująca składowa, tzw. wzmocnienie pola elektromagnetycznego jest ściśle związana

z rodzajem i morfologią metalu osadzonego na podłożu. Szczególnie silne wzmocnienie sygnału ramanowskiego jest obserwowane w przypadku nanostruktur metali o rozmiarach 10–100 nm. Za zjawiskiem tym stoi efekt sprzężenia zlokalizowanych plazmonów powierzchniowych nanocząstek osadzonych na podłożu sensora. Co więcej, w przypadku zastosowania nanostruktur anizotropowych o ostrych krawędziach i wierzchołkach (nanopręty, nanopryzmaty itp.) lub ich dimerów bądź agregatów, wzmocnienie jest dużo większe niż w przypadku sferycznych nanocząstek [16].

Spektroskopia SERS na podłożach nanostrukturalnych stała się niezwykle popularna dzięki bardzo wysokiej czułości, umożliwiającej detekcję nawet na poziomie pojedynczych cząsteczek. Mimo iż efekt wzmocnienia pola elektromagnetycznego ma krótki zasięg i jest odczuwalny jedynie w odległości do kilkudziesięciu nanometrów od powierzchni, możliwe jest jego wykorzystanie w konstrukcji sensorów. Opracowane w ostatnim czasie sensory i biosensory SERS (zarówno bezznacznikowe, jak i wykorzystujące detekcję pośrednią) wydają się być szczególnie obiecujące w analizie środowiskowej i diagnostyce medycznej. Większość czujników SERS bazuje na zależnym od obecności analitu wzmocnieniu sygnału. Na tej zasadzie opracowano m.in. genosensory, aptasensory czy sensory do oznaczania małocząsteczkowych analitów (np. nadtlenku wodoru czy bioanalitów organicznych).

Aktualnie zasadniczymi wyzwaniami stojącymi przed sensorami wykorzystującymi powierzchniowo wzmocnioną spektroskopię Ramana są przede wszystkim: miniaturyzacja detektora (spektrometru), projektowanie warstw receptorowych zapewniających selektywność i jednocześnie kompatybilnych

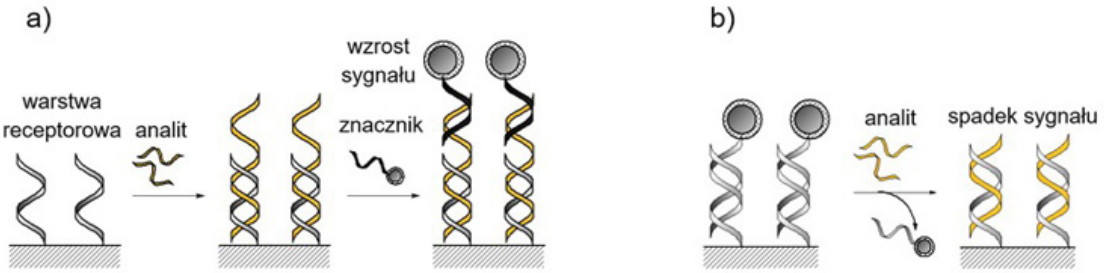
z przetwornikami SERS oraz opracowanie metodyk wytwarzania wysoce powtarzalnych podłoży nanostrukturalnych.

6.2.2 Zastosowanie nanomateriałów jako znaczników

Nowoczesne narzędzia analityczne opracowywane na potrzeby diagnostyki medycznej w laboratoriach czy przy łóżku pacjenta (*Point-of-Care Treatment*, POCT) powinny cechować się przede wszystkim wysoką czułością i specyficznością (definiowaną w rozumieniu medycznym), jak również prostotą odczytu rezultatu. W przeciwieństwie do klasycznie rozumianych sensorów i biosensorów, w większości tego typu analiz nie jest niezbędne dostarczanie informacji w czasie rzeczywistym. Fakt ten otwiera możliwość wykorzystania strategii generowania sygnału niewynikających bezpośrednio z oddziaływania analitu z warstwą receptorową. Wymagania stawiane sensorom, biosensorom oraz szybkim jednorazowym testom bioanalitycznym często wymuszają zaangażowane dodatkowego etapu znakowania. Pozwala to znacząco obniżyć granice detekcji i uprościć proces samego odczytu, jednakże kosztem większego skomplikowania mechanizmu generowania sygnału.

Nanomateriały powierzchniowo modyfikowane receptorami są stosowane w konstrukcji czułych testów analitycznych i biosensorów z uwagi na łatwość dyspersji w roztworach, dużą powierzchnię właściwą oraz wymiary kompatybilne z receptorami molekularnymi

i bioreceptorami. Odpowiedni dobór znacznika powinien umożliwiać prosty odczyt generowanego sygnału (najczęściej optyczny lub elektrochemiczny). Koniugaty nanomateriał–receptor/bioreceptor mogą funkcjonować jako samoistne sensory, jednakże opracowano również wiele konstrukcji wykorzystujących ich oddziaływanie z powierzchnią makroskopowych przetworników. Celem znakowania jest wygenerowanie mierzalnego sygnału bądź wzmocnienie słabego sygnału pochodzącego od związania samego analitu. Tak jak w przypadku innych typów znaczników, w przypadku nanomateriałów wyróżnić można trzy podstawowe mechanizmy działania: wiązanie nanomateriału z powierzchnią sensora (a), jego odłączenie się (b), zmiana położenia na powierzchni wskutek specyficznego wiązania analitu (c). Dwa z nich przedstawiono na rysunku 6.10. W przypadku znakowania koniugatami nanomateriałów zdecydowanie najczęściej jest wykorzystywany układ kanapkowy i to on będzie stanowił podstawowy format dla większości przykładów omawianych w tym rozdziale.



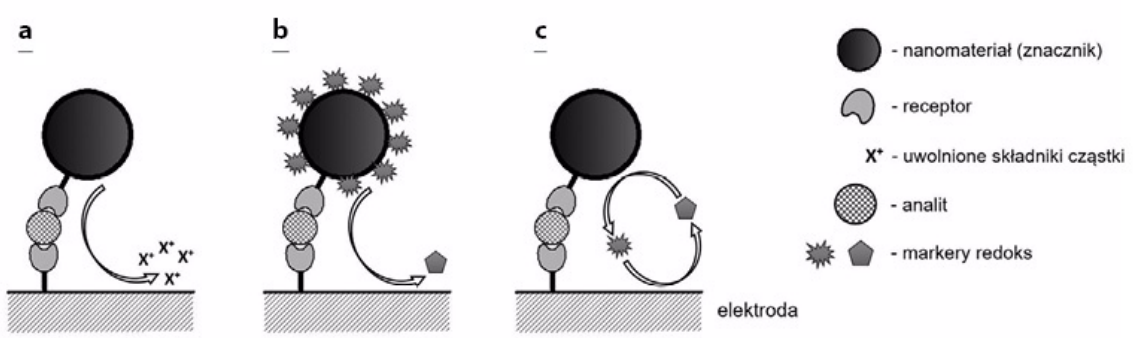
RYS. 6.10

Wybrane mechanizmy działania koniugatów nanomateriałów jako znaczników: a) przyłączanie znacznika – układ kanapkowy, b) odłącznie znacznika – układ kompetycyjny

Rozwiązania wykorzystujące znaczniki nie w pełni odpowiadają klasycznej definicji sensorów, przede wszystkim ze względu na brak możliwości dostarczenia informacji w czasie rzeczywistym oraz częstą niemożność późniejszej regeneracji warstwy receptorowej. Mimo to, rozwiązania funkcjonujące w formacie szybkich testów diagnostycznych w obecnym piśmiennictwie naukowym bardzo często określane są jako sensory z pośrednim typem detekcji. Z uwagi na bardzo dynamiczny rozwój wiedzy w zakresie nanomateriałów w roli znaczników – przede wszystkim w konstrukcji biosensorów i biotestów na potrzeby analizy klinicznej i środowiskowej – w rozdziale przybliżone zostaną główne koncepcje wykorzystania nanomateriałów w roli znaczników w detekcji elektrochemicznej, optycznej oraz masowej [17].

Nanomateriały jako znaczniki elektrochemiczne

Do najczęściej stosowanych systemów detekcji wykorzystujących nanomateriały jako znaczniki należą sensory i biosensory (wolt)amperometryczne. W wariancie bezpośrednim (rys. 6.11b), źródłem sygnału elektrochemicznego jest sama nanocząstka znacznika. Alternatywna strategia wykorzystuje detekcję pośrednią, w której nanocząstka aktywna redoks jest chemicznie roztwarzana lub bierze udział w procesie elektrokatalitycznym. W tym przypadku właściwym źródłem sygnału jest produkt reakcji analitycznej (rys. 6.11a, c).



RYS. 6.11

Źródła sygnału w znacznikach elektrochemicznych: a) materiał nanocząstki (po chemicznym lub elektrochemicznym roztworzeniu), b) aktywność redoks związana z powierzchnią nanocząstki, c) aktywność katalityczna nanocząstki

Czujniki elektrochemiczne z dodatkowym etapem znakowania nanomateriałami pozwalają na osiągnięcie ultraniskich granic oznaczalności bioanalitów. Znaczące wzmocnienie sygnału można wytłumaczyć stosunkowo dużymi rozmiarami nanocząstek w porównaniu do molekularnych znaczników redoks. Dzięki temu, związanie nawet bardzo niewielkiej ilości znacznika (odpowiadające niskiemu stężeniu substancji oznaczanej) jest w stanie wygenerować stosunkowo dużą zmianę sygnału. Ogromne znaczenie ma również fakt, że detekcja woltamperometryczna, w przeciwieństwie do technik optycznych, bazuje na procesach zachodzących bezpośrednio na powierzchni przetwornika [18].

Wiele nanomateriałów wykazuje swoistą elektroaktywność, której źródłem może być sam materiał znacznika (np. nanocząstki tlenków metali przejściowych, błękitu pruskiego, nanostruktury polimerów przewodzących). Istnieje jednak duża grupa nanomateriałów, które w postaci makroskopowej nie wykazują cech materiału elektroaktywnego a swoją aktywność w procesach redoks

zawdzięczają odmiennym właściwościom w nanoskali. Przykładem takiego materiału są nanokryształy półprzewodnikowe, czyli kropki kwantowe.

Strategia wykorzystująca roztworzenie znacznika umożliwia znaczącą amplifikację sygnału chemicznego, wynikającą z wydzielenia znacznej ilości jonów wchodzących w skład nanocząstki (rys. 6.11a). W przypadku warstw immobilizowanych bezpośrednio na powierzchni elektrod, dodatkowym atutem z punktu widzenia czułości sensora jest bliskość przetwornika, a co za tym idzie ograniczenie dyfuzji czynnika elektroaktywnego. Niestety, strategie bazujące na roztwarzaniu nanocząstek i oznaczaniu elektroaktywnych składników na ogół wymagają drastycznej zmiany warunków reakcji (pH) bądź dodatkowych reagentów, co znacząco komplikuje procedurę pomiarową [19]. Najważniejsze typy nanomateriałów i strategie generowania przy ich udziale sygnału elektrochemicznego zestawiono w tabeli 6.1.

TABELA 6.1

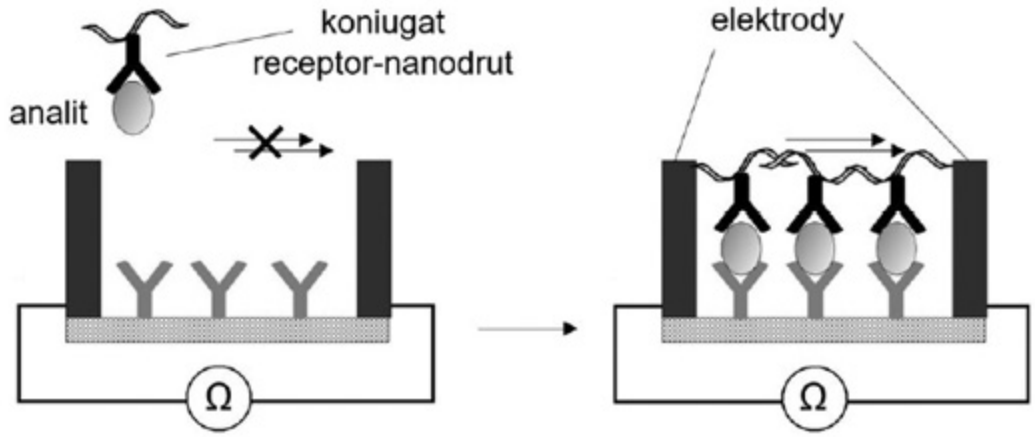
Nanocząstki jako źródło sygnału elektrochemicznego po ich roztworzeniu

Nanomateriał:	Czynnik oznaczany:	Sposób uwolnienia:	Detekcja:
AuNPs	kompleks Au(III)	utlenienie (Br_2/HBr)	ASV
QDs (CdSe, ZnS, PbS i inne)	kationy metali: Cd^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}	roztworzenie (HCl, HNO_3) utlenienie (H_2O_2)	ASV, potencjometryczna
AgNPs	Ag^+	elektroutlenienie	LSV

Inną grupą znaczników sensorów i biosensorów elektrochemicznych są nanomateriały przewodzące. Mechanizm działania opartych na nich sensorów konduktometrycznych polega na zmianie przewodnictwa w warstwie receptorowej znajdującej się

pomiędzy dwiema obojętnymi elektrodami pełniącymi funkcję przetwornika (rys. 6.12). Szczególnie atrakcyjnymi znacznikami w sensorach konduktometrycznych są przewodzące nanomateriały anizotropowe 1D i 2D, np. nanodruty metaliczne lub nanowłókna polimerów przewodzących oraz nanorurki węglowe. Dzięki dużej ruchliwości nośników prądu wzdłuż osi podłużnej i niewielkiemu oporowi (za co odpowiada relatywnie mała liczba nanocząstek potrzebna do uzyskania połączenia elektrycznego elektrod) stosunkowo łatwo jest wygenerować duże zmiany przewodności w wyniku związania znacznika.

Do elektrochemicznych strategii detekcji sygnału wykorzystujących znaczniki w postaci nanomateriałów zaliczyć należy także sensory impedancyjne. Mimo iż technika spektroskopii impedancyjnej umożliwia prowadzenie oznaczeń w trybie bezznacznikowym (bazując na zwiększonym oporze przeniesienia ładunku wywołanym samą obecnością związanego analitu) to dodatkowe znakowanie za pomocą nanomateriału znacząco podnosi czułość sensora. Jest to szczególnie istotne w przypadku oznaczania analitów małocząsteczkowych. Co istotne, w sensorach impedancyjnych (w przeciwieństwie do pozostałych sensorów elektrochemicznych) nie ma konieczności stosowania nanomateriałów wykazujących właściwości przewodzące czy elektroaktywność. Z tego względu w immuno- i aptasensorach impedancyjnych zastosowanie znalazła zastosowanie szeroka gama koniugatów nanomateriałów.



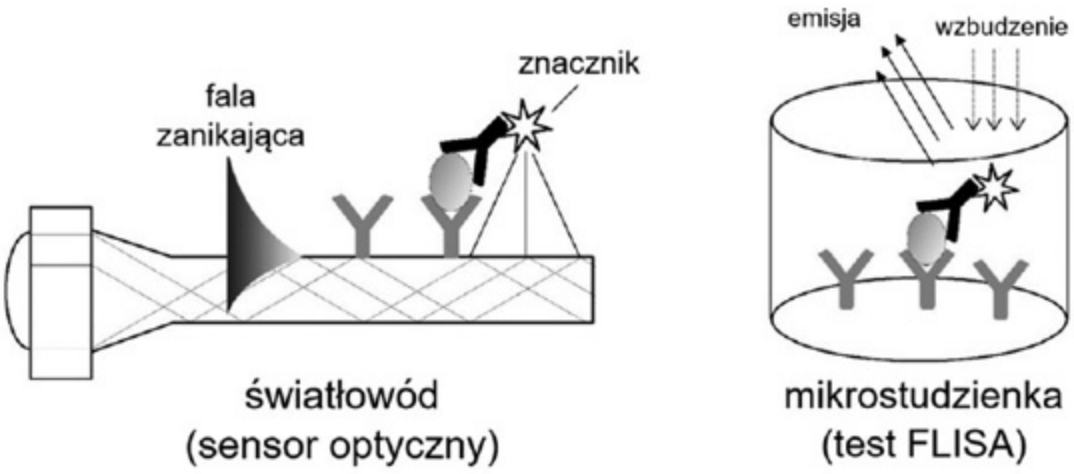
RYS. 6.12
Nanodruty jako znaczniki immunosensora konduktometrycznego

Nanomatriały jako znaczniki optyczne

Ze względu na wykorzystywanie tej samej aparatury i niewielki wpływ układu pomiarowego na mechanizm generowania sygnału, zarówno w przypadku klasycznych pomiarów spektroskopowych, jak i sensorów optycznych są stosowane podobne rozwiązania wykorzystujące nanomateriały. Jako dobry przykład mogą posłużyć warstwy receptorowe biosensorów optycznych (np. światłowodowe sensory z detekcją fluorescencji znacznika), które mogą zostać z łatwością zaadaptowane do formatu klasycznych testów, np. realizowanych w płytce wielodołkowej (rys. 6.13). Z tego względu w podrozdziale przedstawione zostaną uniwersalne koncepcje wykorzystania nanomateriałów do generowania sygnału optycznego, które wykazują potencjał aplikacyjny w konstrukcji sensorów.

W przeciwieństwie do nanomateriałów funkcjonujących jako samoistne sensory, **znaczniki optyczne** powinny cechować się

stabilnością i wysoką intensywnością generowanego sygnału tak, żeby odpowiedź sensora pozostawała zależna jedynie od ilości oznaczanego analitu związanego przez warstwę receptorową. Wiele rodzajów nanocząstek spełnia te warunki, wykazując wysoką i stabilną luminescencję bądź zdolność do absorpcji promieniowania elektromagnetycznego. W roli znaczników fluorescencyjnych najszerzej wykorzystywane są trzy zasadnicze grupy nanomateriałów: kropki kwantowe, kropki węglowe i nanosfery polimerowe. Najbardziej znanym formatem testu diagnostycznego wykorzystującego znaczniki fluorescencyjne (w tym koniugaty nanofluoroforów) jest tzw. test immunofluorescencyjny FLISA (ang. *fluorescence-linked immunosorbent assay*), będący analogiem szeroko rozpowszechnionego testu ELISA, pozwalającym jednak na bezpośrednią detekcję emisji fluorescencji znacznika w miejsce oznaczania produktu reakcji enzymatycznej [20].



RYS. 6.13

Warstwa receptorowa immunosensora z detekcją fluorescencji. Po lewej – format sensora na bazie światłowodu, po prawej – format testu FLISA na płytce 96-dołkowej

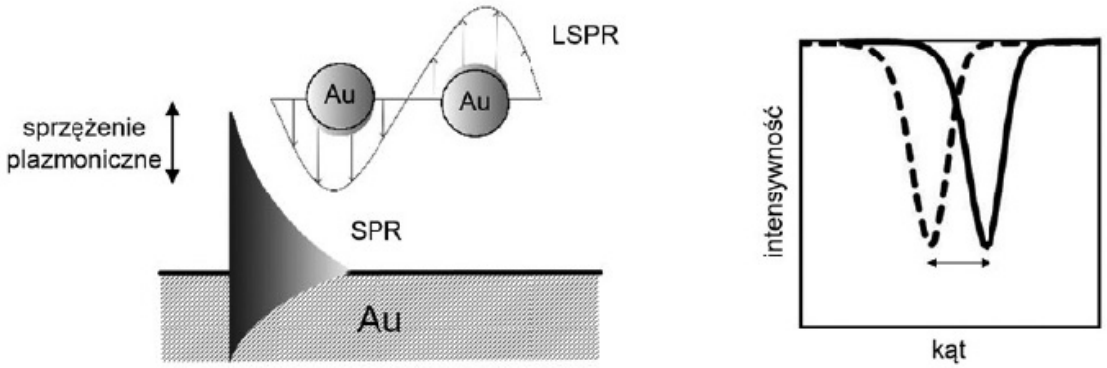
Mniej wymagające pod względem konstrukcyjnym w porównaniu do sensorów fluorescencyjnych są sensory wykorzystujące zjawisko elektrochemiluminescencji (ECL). Luminescencja większości typów kropek kwantowych i niektórych typów nanocząstek (np. TiO_2, nanoklasterów Cu) może być wzbudzana bezpromieniście, poprzez reakcje redoks w obrębie nanocząstek indukowane przyłożonym, zewnętrznym potencjałem. Sensory tego typu nie potrzebują więc zewnętrznego źródła światła do wzbudzenia emisji. Jako popularne, uniwersalne przetworniki sensorów wykorzystujących znaczniki ECL typowo wykorzystuje się transparentne podłoża przewodzące, pełniące funkcję elektrod, np. tlenek indu i cyny (ITO).

Niektóre nanomateriały występujące w postaci koloidalnej, przede wszystkim nanocząstki złota i srebra, charakteryzują się bardzo wysokimi wartościami molowych współczynników absorpcji, sięgających wartości rzędu 10^8–10^9 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$. Tak wysoka absorpcja właściwa wynika zarówno z właściwości plazmonicznych tych nanocząstek, jak i ich dużego rozmiaru w porównaniu z cząsteczkami barwników organicznych. Dla porównania, molowy współczynnik absorpcji produktu utleniania 3,3′,5,5′-tetrametylobenzydyny (niebieskiego barwnika stosowanego w testach ELISA i uchodzącego za najbardziej czuły w detekcji optycznej) wynosi zaledwie około $5\cdot10^4$ $M^{-1}\cdot cm^{-1}$. Mimo niewątpliwego potencjału, koniugaty nanocząstek złota nie znalazły jednak zastosowania jako znaczniki w klasycznych sensorach i biosensorach z detekcją optyczną z uwagi na niewielką czułość detekcji spektrofotometrycznej. Wyjątek na tym tle stanowią jednak szybkie testy immunochromatograficzne, których zasada działania została opisana szczegółowo w rozdziale dotyczącym biosensorów.

Nanomateriały jako plazmoniczne znaczniki SPR i SERS

W przypadku potrzeby poprawy czułości lub obniżenia granicy detekcji sensora SPR lub LSPR działającego w trybie detekcji bezpośredniej (co częste w przypadku oznaczeń analitów o małej masie cząsteczkowej lub w bardzo niskich stężeniach), jest możliwe wtórne znakowanie prowadzące do wzmocnienia sygnału. Mimo iż teoretycznie do tego celu jest możliwe użycie dowolnego typu nanocząstek, zdecydowanie najczęściej do tego celu są wykorzystywane koniugaty nanocząstek złota. Wybór ten jest podyktowany po części ich dużą masą, której asocjacja wpływa na zmianę lokalnego współczynnika załamania światła, a tym samym znaczące przesunięcie kąta rezonansowego. Jednakże cechą wyróżniającą nanocząstki złota spośród innych znaczników jest generowany przez nie efekt zlokalizowanego rezonansu plazmonowego. Zjawisko LSPR generuje duże wzmocnienie natężenia pola elektrycznego w bliskim otoczeniu nanocząstek. Wzmocnione pole elektromagnetyczne generowane przez nanocząstkę związaną w bardzo niewielkiej odległości od przetwornika wchodzi w interakcję z falą powierzchniową (rys. 6.14). Związany z tym efekt zwany sprzężeniem plazmonicznymi (*plasmonic coupling*) skutkuje drastyczną zmianą kąta rezonansowego SPR, znacząco większą niż wynikałoby to z zaasocjowanej masy nanocząstki [21]. Na podobnej zasadzie działają również znaczniki SERS, gdzie dodatkowe przyłączenie

nanomateriału w bezpośrednim sąsiedztwie przetwornika powoduje silne wzmocnienie sygnału ramanowskiego.



RYS. 6.14

Schemat wzmocnienia plazmonicznego sygnału SPR generowanego przez nanocząstkę złota

Sprzężenie plazmoniczne, podobnie jak sam rezonans plazmonowy, jest oddziaływaniem krótkozasięgowym. Z tego względu konieczne jest takie zaprojektowanie warstwy receptorowej biosensorów SPR i LSPR, aby odległość znacznika od powierzchni sensora była możliwie jak najmniejsza (w praktyce nie powinna przekraczać 30 nanometrów). Najbardziej efektywne pod tym względem jest znakowanie biosensorów DNA, gdyż dzięki niewielkiemu rozmiarowi receptorów oligonukleotydowych jest możliwe uzyskanie silnego wzmocnienia sygnału nawet w przypadku wykrywania krótkich sekwencji oligonukleotydowych. Znakowanie nanocząstkami plazmonicznymi znajduje również zastosowanie w konstrukcji immunosensorów, gdzie pozwala na obniżenie granic detekcji sensorów SPR nawet o dwa do trzech rzędów wielkości. Pewnym ograniczeniem w konstrukcji immunosensorów i aptasensorów typu kanapkowego do wykrywania

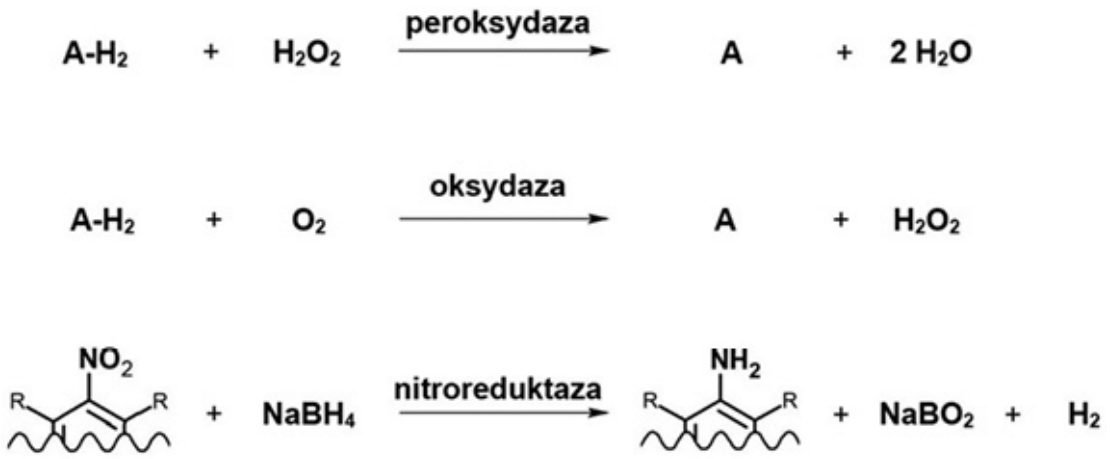
małocząsteczkowych analitów jest konieczność zastosowania dwóch różnych receptorów (np. przeciwciał rozpoznających dwa różne epitopy tego samego antygenu). W przypadku niedostępności odpowiedniej pary receptorów bądź zbyt małych rozmiarów cząsteczki wykrywanej (skutkujących występowaniem przeszkód sterycznych podczas tworzenia immunokompleksu), podobnie jak w przypadku innych formatów wykorzystujących znaczniki, konieczne jest zaprojektowanie sensora kompetycyjnego.

Nanomateriały jako znaczniki katalityczne

Osobną grupę znaczników, stosowanych przede wszystkim w biosensorach, stanowią znaczniki katalityczne. Z uwagi na podobieństwo mechanizmu działania, nanocząstki wchodzące w ich skład często określane są mianem „sztucznych enzymów" bądź „nanozymów". Koloidalne nanocząstki katalityczne funkcjonalizowane powierzchniowo bioreceptorami dopełniającymi stanowią coraz większą konkurencję dla rutynowo stosowanych w testach diagnostycznych koniugatów enzymów. Podstawową przyczyną rosnącej popularności nanomateriałów katalitycznych jako znaczników są ograniczenia enzymów, takie jak wysokie koszty izolacji oraz białkowa natura, która powoduje podatność na inhibicję. Zdecydowanie największe znaczenie w konstrukcji sensorów chemicznych i testów bioanalitycznych mają aktywności katalityczne nanocząstek typu peroksydazy, oksydazy oraz nitroreduktazy (rys. 6.15). Znane są jednak również przykłady wykorzystania

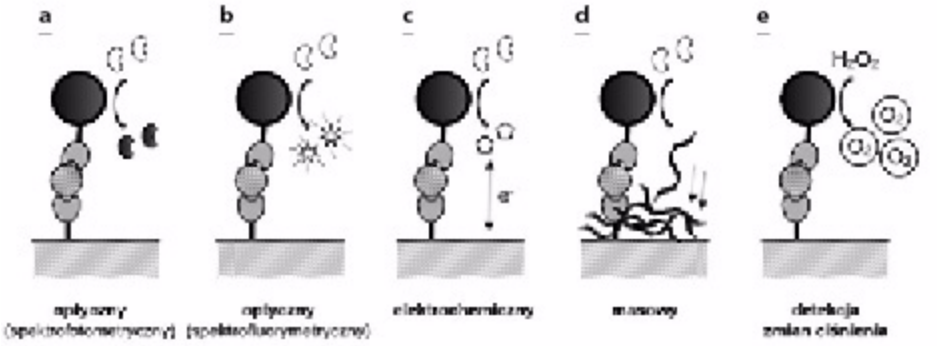
w bioanalityce aktywności nanocząstek typu oksydazy glukozowej, oksydazy polifenolowej, lakazy i dysmutazy ponadtlenkowej [22].

Dzięki szerokiej gamie dostępnych substratów reakcji katalizowanych przez nanomateriały, mogą być one projektowane jako komponenty sensorów i testów bioanalitycznych o różnych strategiach generowania sygnału. W wielu przypadkach, poprzez odpowiedni dobór substratu reakcji katalitycznej możliwe jest zastosowanie tego samego znacznika katalitycznego w różnych systemach detekcji (rys. 6.16). Istnieją różne substraty peroksydaz dające produkty barwne, fluorescencyjne, elektroaktywne czy strącające z roztworu. Przykładowo, taka sama konstrukcja warstwy receptorowej, wykorzystującej nanocząstki o jednoczesnej (sterowanej pH) aktywności peroksydazy chrzanowej i katalazy (np. RuO_2) może zostać z powodzeniem zastosowana w konstrukcji sensorów z detekcją optyczną, elektrochemiczną, masową a nawet detekcją zmiany ciśnienia (na podstawie katalitycznego rozkładu H_2O_2 z wydzieleniem gazowego tlenu) [23, 24]. Podstawowe strategie wykorzystujące znaczniki katalityczne w sensorach powinowactwa przedstawiono na rysunku 6.16.



RYC. 6.15

Reakcje katalizowane przez nanomateriały o aktywności mimetyków enzymów stosowane w znacznikach



RYS. 6.16

Różne strategie generowania sygnału znaczników katalitycznych

Sensory bazujące na mechanizmie znakowania z udziałem katalitycznych nanocząstek z reguły oferują większą czułość niż analogiczne znaczniki wykorzystujące bezpośrednią detekcję znacznika. Dzieje się tak dlatego, że reakcja katalityczna prowadzi do tzw. amplifikacji sygnału, czyli jego zwielokrotnienia. Pojedyncza nanocząstka katalityczna jest w stanie wygenerować znaczną ilość produktu reakcji katalitycznej, którą dodatkowo można regulować poprzez odpowiedni dobór czasu reakcji. Ten mechanizm – znany chociażby z szeroko rozpowszechnionych testów immunoenzymatycznych typu ELISA – pozwala na łatwe projektowanie warstw receptorowych o atrakcyjnych parametrach analitycznych. Odbywa się to jednak kosztem skomplikowania i wydłużenia czasu analizy.

Obecne kierunki rozwoju nanomateriałów jako znaczników katalitycznych skupiają się głownie na opracowywaniu nanocząstek o nowych typach aktywności, poprawie selektywności

katalizowanych przez nie reakcji oraz nowych strategii ich koniugacji z bioreceptorami. To właśnie mała selektywność katalizy reakcji redoks, jak również konieczność znalezienia kompromisu pomiędzy zachowaniem aktywnej powierzchni a jej funkcjonalizacją (adsorpcja cząstek receptorów i składników próbki pogarsza aktywność katalityczną nanomateriału), stanowią obecnie główne przeszkody uniemożliwiające pełne zastąpienie znaczników enzymatycznych (np. peroksydaz) w rozwiązaniach komercyjnych.

Nanomateriały jako znaczniki w innych systemach detekcji

Czułość warstw receptorowych biosensorów mikromechanicznych czy piezoelektrycznych zależy bezpośrednio od masy cząsteczkowej wykrywanego związku. Stanowi to ograniczenie przy oznaczaniu niskich poziomów cząsteczek organicznych (np. pestycydów czy toksyn) na potrzeby analizy środowiskowej. Poza typowym zastosowaniem warstw nanomateriałów w celu rozwinięcia powierzchni przetwornika, w sensorach masowych niekiedy wykorzystuje się również funkcjonalizowane powierzchniowo nanomateriały w postaci koloidalnej w roli znaczników. Koniugaty nanomateriałów z receptorami molekularnymi i bioreceptorami wykorzystywane są do bezpośredniego **wzmacniania sygnału sensorów masowych**. Z uwagi na relatywnie dużą masę, nanocząstki metaliczne czy nanosfery polimerowe pełnią funkcję swoistych „obciążników”, co przyczynia się do znaczącej amplifikacji sygnału. Warto podkreślić, że piezoelektryczne i mikromechaniczne

sposoby detekcji należą do wąskiej grupy technik w założeniu niewymagających znakowania (*label-free*), w których sam akt związania analitu (asocjacja masy na powierzchni) odpowiada za zmianę częstotliwości drgań przetwornika piezoelektrycznego czy wychylenie nanodźwigni. Mechanizmy amplifikacji sygnału sensorów masowych z wykorzystaniem nanomateriałów pozwalają wprawdzie na znaczące obniżenie granic detekcji analitów małocząsteczkowych, jednak odbywa się to kosztem skomplikowania procedury pomiarowej oraz utraty możliwości pracy ciągłej w trybie monitorowania, przez co ich zastosowanie jest ograniczone.

Wartą osobnego omówienia klasą nanomateriałów wykorzystywanych w sensorach i testach bioanalitycznych są nanocząstki tlenku żelaza(II,III) [25]. Dzięki właściwościom superparamagnetycznym, koniugaty nanocząstek Fe_3O_4 zyskały popularność w bioanalityce przede wszystkim jako nanosorbenty do magnetycznej separacji składników próbek. W zależności od selektywności nadanej im przez ligandy powierzchniowe, z pomocą nanocząstek magnetycznych możliwe jest selektywne wyodrębnienie oznaczanego analitu lub cząsteczek interferentów. Przykładowo, magnetyczna separacja kwasów nukleinowych z użyciem nanocząstek Fe_3O_4 powierzchniowo modyfikowanych krzemionką stała się uniwersalnym narzędziem przygotowania próbek w większości procedur stosowanych w biologii molekularnej, włączając w to wykrywanie specyficznych sekwencji RNA i DNA z wykorzystaniem biosensorów. Z perspektywy parametrów pracy sensorów, zasadniczą korzyścią magnetycznej prekoncentracji analitu jest skrócenie czasu odpowiedzi poprzez likwidację bariery związanej z dyfuzją analitu z objętości próbki. Poza wskazanymi

wyżej korzyściami, nanocząstki Fe_3O_4 mogą również stanowić źródło sygnału i być stosowane jako znaczniki w kilku typach sensorów. Na uwagę zasługuje tutaj dedykowany znacznikom magnetycznym system polegający na detekcji pola magnetycznego z wykorzystaniem przetworników magnetooporności owych (*magnetoresistive sensors*). Mimo ograniczonych możliwości bezpośredniej, chemicznej funkcjonalizacji tlenku żelaza(II,III) receptorami, w ostatnich latach opracowany została szeroka pula nanocząstek magnetycznych typy rdzeń–powłoka i stabilizatorów powierzchni znakomicie ułatwiających koniugację z popularnymi grupami bioreceptorów, co bez wątpienia sprzyjać będzie wzrostowi popularności znaczników magnetycznych.

6.2.3
Przykłady zastosowań

Zastosowanie nanomateriałów w konstrukcji przetworników i warstw receptorowych jest obecnie głównym kierunkiem rozwoju sensorów chemicznych i biosensorów. Jednakże dziedzina ta jest ciągle na stosunkowo wczesnym etapie i na drodze do skutecznej komercjalizacji sensorów i biosensorów na bazie nanomateriałów konieczne jest rozwiązanie szeregu aktualnych problemów. Do najważniejszych zaliczyć można trudności z kontrolą i powtarzalnością procesu syntezy i organizacji warstw nanomateriałów na powierzchni czy ich powierzchniowej funkcjonalizacji.

Na obecną chwilę wskazać można już kilka przykładów sukcesu komercyjnego sensorów i szybkich testów diagnostycznych wykorzystujących nanomateriały, m. in. nanostrukturalne podłoża sensorów SERS i LSPR, czy testy immunochromatograficzne znakowane koloidalnym złotem. Poniżej zasygnalizowane zostały przykłady praktycznych zastosowań makroskopowych sensorów i biosensorów wykorzystujących nanomateriały jako kluczowe komponenty warstwy przetwornikowej, receptorowej czy znaczniki.

Sensory z nanomateriałami w roli podłoża chemorezystywnego (np. podłoża ze zredukowanego tlenku grafenu) są wykorzystywane jako sensory gazowe do oznaczania między innymi tlenku azotu(IV), amoniaku czy lotnych związków organicznych. Źródłem sukcesu nanomateriałów jako komponentów sensorów gazowych jest ich duża powierzchnia właściwa, przekładająca się bezpośrednio na czułość urządzeń. Dzięki szerokiej gamie dostępnych analitów gazowych, sensory takie znajdują zastosowanie m.in. w analizie środowiskowej jako czujniki zanieczyszczeń powietrza i gazów trujących (CO, H_2S), diagnostyce medycznej czy kontroli procesowej (np. w badaniach procesów fermentacji). Obecnie główną ścieżką rozwoju sensorów do pomiarów w próbkach ciekłych jest nadawanie im nowych selektywności dzięki powierzchniowej funkcjonalizacji bioreceptorami. Skonstruowane w ostatnich latach biosensory konduktometryczne, podobnie jak biosensory typu FET, umożliwiają wykrywanie między innymi szerokiej gamy białkowych biomarkerów chorobowych, specyficznych sekwencji DNA czy cząstek wirusów.

Przykładem praktycznego zastosowania nanomateriałów jako komponentów sensorów elektrochemicznych są niektóre **typy**

elektrod drukowanych na podłożach elastycznych. Rozwiązania tego typu są szczególnie pożądane jako elementy tzw. ubieralnych sensorów (ang. *wearable sensors*) na podłożach polimerowych czy tkaninowych. Do tej klasy sensorów wykorzystujących nanomateriały bądź ich kompozycje polimerowe można zaliczyć miniaturowe czujniki potencjometryczne ze stałym kontaktem do monitorowania pH i elektrolitów oraz czujniki amperometryczne do oznaczania wybranych bioanalitów (glukoza, mleczany) bezpośrednio w płynach fizjologicznych, takich jak pot czy łzy [12]. Czujniki tego typu przybierają formę naskórnych tatuaży/naklejek czy elementów zintegrowanych z odzieżą.

Nanostrukturalne podłoża na bazie złota znalazły zastosowanie w komercyjnych przetwornikach z detekcją optyczną: **LSPR i SERS**. Przetworniki w postaci cienkich warstw nanostruktur złota na stałych, transparentnych podłożach, dzięki unikalnym właściwościom plazmonicznym i optycznym stały się alternatywą dla klasycznych podłoży SPR i SERS. Mimo pewnych ograniczeń (wspólnych z innymi technikami bezznacznikowymi) w ostatnich latach obserwujemy dynamiczny rozwój technologii LSPR, który zaowocował opracowaniem przez firmę Nicoya pierwszego komercyjnego systemu do badania oddziaływań funkcjonującego w trybie transmisyjnym (monitorowanie zmian lokalnego maksimum plazmonicznego) na podstawie technologii przetworników opartych na nanostrukturalnym złocie. Z kolei opracowanie metodyk wytwarzania wysoce powtarzalnych podłoży nanostrukturalnych Ag i Au umożliwiło komercjalizację podłoży SERS. Ultraczułe, nanostrukturalne podłoża SERS produkowane przez Ocean Insight oferują duże wzmocnienia sygnału niezbędne w przypadku

oznaczania śladowych ilości małocząsteczkowych analitów, m.in. melaminy czy narkotyków. Zyskujące obecnie na znaczeniu metody *top-down* (litografia i wytrawianie powierzchni za pomocą wysokoenergetycznych jonów bądź metodami elektrochemicznymi) stanowią atrakcyjną alternatywę wobec osadzania nanomateriałów z postaci koloidalnej, gdyż pozwalają uzyskać lepszą kontrolę nad morfologią powierzchni. Zarówno jakość i powtarzalność nanostrukturalnych przetworników LSPR/SERS, jak i ich ceny, czynią je coraz bardziej konkurencyjnymi względem stosowanych dotychczas, klasycznych przetworników.

Przykładem zastosowania nanomateriałów w konstrukcji szybkich testów o zdecydowanie największym znaczeniu komercyjnym są testy immunochromatograficzne typu *lateral flow assay* (LFA). Za ich sukcesem stoją przede wszystkim: szerokie zapotrzebowanie na jednorazowe narzędzia diagnostyczne i uniwersalność. Obecnie większość dostępnych komercyjnie testów paskowych, m.in. do jakościowego wykrywania biomarkerów (np. specyficznych typów przeciwciał w próbkach surowicy krwi) i antygenów wirusowych (np. białek adenowirusów, RSV, SARS CoV-2) czy testów ciążowych, w roli znaczników wykorzystuje nanocząstki złota lub barwione nanosfery polimerowe. Testy immunochromatograficzne zawdzięczają swoją czułość i prostotę odczytu (poprzez ocenę wzrokową), z jednej strony intensywnej barwie nanocząstek, z drugiej zaś, membranie nitrocelulozowej w roli podłoża. Zastosowane materiału porowatego zapewnia bardzo dużą powierzchnię właściwą, co umożliwia wydajne wiązanie znacznika w wąskim polu testowym i jednocześnie ułatwia obserwację zmiany barwy. Testy typu LFA mimo prostoty konstrukcji ciągle oferują

olbrzymie możliwości rozwoju zarówno pod kątem poprawy parametrów analitycznych (np. dodatkowa amplifikacja sygnału poprzez zastosowanie nanocząstek katalitycznych czy magnetycznych) czy udoskonalenia aspektów użytkowych (instrumentalizacja i automatyzacja odczytu – również ilościowego – poprzez zastosowanie znaczników np. elektrochemicznych czy fluorescencyjnych).

Ciekawym przykładem sukcesu komercyjnego nanomateriałów koloidalnych w szeroko pojętej bioanalityce jest również wykorzystanie nanosfer magnetycznych do ekstrakcji i oczyszczania składników próbek. Dzięki łatwości separacji magnetycznej nanocząstki tego typu (często dodatkowo funkcjonalizowane ligandami takimi jak przeciwciała, streptawidyna, kwasy nukleinowe, cząsteczki z terminalnymi grupami aminowymi/karboksylowymi, białko A/G itp.) są szeroko stosowane w komercyjnych, często zautomatyzowanych protokołach przygotowania próbek, m.in. do reakcji RT-PCR (ekstrakcja RNA – diagnostyka genetyczna), analiz proteomicznych czy testów immunodiagnostycznych.

Obecnie na drodze komercjalizacji wielu typów sensorów i testów diagnostycznych wykorzystujących nanomateriały stoi przede wszystkim brak odpowiedniej wiedzy i technologii w zakresie metod wytwarzania nanocząstek (zarówno na powierzchni – *top down*, jak i syntezy w roztworach – *bottom up*) oraz strategii samoorganizacji i nanoarchitektonicznej manipulacji. Niewątpliwym ograniczeniem jest też większe skomplikowanie zarówno metod wytwarzania tego typu sensorów, jak i późniejszej procedury analitycznej (wprowadzenie dodatkowych etapów). Jednak w dłuższej perspektywie, wraz z rozwojem nanotechnologii początkowe

trudności związane z wprowadzeniem nanomateriałów do warstw receptorowych sensorów będą stopniowo traciły na znaczeniu. Pozwoli to wykorzystać pełnię możliwości nanomateriałów, które wpłyną na znaczącą poprawę kluczowych parametrów analitycznych (czułość i granica oznaczalności, czas odpowiedzi, czas życia). Nanomateriały otwierają również nowe możliwości w kontekście miniaturyzacji obecnie istniejących rozwiązań, czy też wykorzystania ich w postaci zintegrowanej z mikrosystemami przepływowymi w nowoczesnych i zautomatyzowanych systemach funkcjonujących w trybie POCT. Dzięki rozwojowi nanotechnologii, w ciągu ostatnich kilkunastu lat wykształciła się również całkowicie nowatorska koncepcja konstrukcji sensorów (szczegółowo omówiona w podrozdziale 6.3), która polega na rezygnacji z klasycznego formatu opartego na makroskopowych przetwornikach i wykorzystująca nanomateriały jako samodzielne nanosensory.

6.3
Mikro- i nanomateriały samodzielne jako sensory

Krzysztof MAKSYMIUK, Agata MICHALSKA

6.3.1
Nanostruktury – nanocząstki jako

samodzielne sensory

Z punktu widzenia ogólnie pojętej konstrukcji sensora nanomateriały mogą pełnić różne funkcje: związane zarówno z budową czujnika (np. warstwa nanorurek węglowych może odgrywać rolę wyprowadzenia elektrycznego), jak i z generowaniem sygnału analitycznego (np. warstwa nanocząstek złota zmodyfikowanych bioreceptorem). Podział taki jest umowny – obie funkcje nanomateriałów mogą się przenikać w znacznym stopniu, jednak wspólną cechą sensorów w takim rozumieniu jest wykorzystanie mikro- czy nanomateriałów do otrzymywania warstw. Alternatywnym rozwiązaniem jest wykorzystanie materiałów nanostrukturalnych, w postaci dyspersji – każda drobina mikro- czy nanostrukutralna jest samodzielnym sensorem, zawieszonym w roztworze próbki. Zawiesina mikro- czy nanostruktur – dyspersja sensorów w roztworze – oferuje z punktu widzenia analitycznego szereg korzyści, ale także wiąże się z pewnymi ograniczeniami.

Jedną z zalet wykorzystania mikro- czy nanostruktur zdyspergowanych, czyli mikro- i nanocząstek jako sensorów, jest unikatowa możliwość obserwowania zmian stężenia analitów w czasie rzeczywistym dla procesów zachodzących w konkretnym miejscu w próbce, to znaczy uzyskanie rozdzielczości przestrzennej rejestrowanych sygnałów. Nanostruktury tworzące trwałą zawiesinę samorzutnie poruszają się w ośrodku ciekłym, ruch nanosensorów w próbce może również być wymuszony, np. przez zastosowanie pola magnetycznego, pod warunkiem obecności drobin magnetycznych w nanostrukturze.

Pewnym ograniczeniem technicznym w przypadku wykorzystania układów zdyspergowanych jest konieczność nadania mikro- czy nanostrukturze wszystkich funkcji sensora. Na przykład wprowadzenie do nanostruktury cząsteczki odgrywającej rolę receptora wymaga ulokowania jej w odpowiednim środowisku, zarówno z punktu widzenia reakcji z analitem, jak i wyeksponowania odpowiednich właściwości receptora. Istotne może być też dodanie przetwornika, jeśli jego obecność jest pożądana, czy zapewnienie odpowiednich warunków np. pH. Tak więc zarówno procesy rozpoznania chemicznego, jak i generowanie sygnału analitycznego muszą dokonywać się w ograniczonej objętości drobiny materiału – nano- czy mikrostruktury, niekiedy wymuszając dostosowanie warunków panujących w próbce (np. przez dodanie buforu pH), co jest możliwe tylko w warunkach *in vitro*.

Wśród układów nanostrukturalnych wykorzystywanych jako sensory zdyspergowane dominują nanocząstki. Otrzymanie trwałej w czasie zawiesiny nanocząstek wymaga w większości przypadków zastosowania koloidu ochronnego, substancji, która adsorbując się na powierzchni nanocząstek, nadaje im pewien ładunek i utrudnia koalescencję, tworzenie się agregatów. Należy podkreślić, iż obecność tego typu związków może jednak osłabić oddziaływanie nanocząstek z analitem, np. utrudniając wymianę jonową przez blokowanie powierzchni nanostruktury. W przypadku nanocząstek z polimerów lipofilowych, rolę tę może odgrywać np. alkohol poliwinylowy (np. stosowany w postaci roztworu o stężeniu 1% mas.), w przypadku nanostruktur złota wykorzystuje się zwykle znaczne powinowactwo złota do siarki, modyfikując powierzchnię nanocząstek tiolami, z kolei nanorurki węglowe dysperguje się,

wykorzystując najczęściej związki powierzchniowo aktywne. Z punktu widzenia zastosowań analitycznych jest to często ograniczeniem, ponieważ limituje możliwość oddziaływania analitu z powierzchnią mikro- czy nanostrukturalnego sensora.

Układy zdyspergowane są użyteczne przede wszystkim jako szeroko rozumiane sensory optyczne, w tym sensory pozwalające na ocenę wizualną. Z tego punktu widzenia szczególnie korzystne jest stosowanie układów nanostrukturalnych, w których rozproszenie światła na drobinach nie jest przeszkodą do prowadzenia analizy metodą kolorymetryczną. Jednak uwzględniając prowadzenie analizy w próbkach rzeczywistych, w układach biologicznych, szczególnie ważne są nanostrukturalne układy aktywne w trybie emisji. Nanocząstki wykorzystywane w trybie emisji pozwalają na prowadzenie analizy np. w aktywnych biologicznie układach, nawet w żyjących mikroorganizmach. Inną korzyścią analityczną jest możliwość zamknięcia w jednej strukturze kilku odczynników istotnych dla generowania sygnału analitycznego, czy też odizolowanie odczynnika użytecznego w generowaniu odpowiedzi sensora, ale potencjalnie toksycznego, od badanego układu. Zamknięcie odczynników w nanocząstkach pozwala również zastosować związki, które dodane bezpośrednio do próbki byłyby nietrwałe w jej środowisku, czy też osiągnąć (lokalnie w nanostrukturze) pożądane stężenie reagenta. Wykorzystanie nanostruktur pozwala także na wprowadzenie do sensora, np. barwnika odniesienia – którego widmo nie zależy od zmian stężenia analitu, ale ułatwia prowadzenie oznaczeń. Zmodyfikowanie powierzchni nanostruktury – sensora, tak aby zawierała np. specyficzne bioreceptory pozwala skierować je w taki sposób, aby

były akumulowane w określonym miejscu w próbce (np. w tkance) i generowały sygnał analityczny odpowiadający lokalnym zmianom stężenia, umożliwiając śledzenie wybranych procesów *in situ*. Ponadto mała objętość jednostkowego sensora pozwala ograniczyć zaburzenie w badanym systemie, co jest szczególnie istotne w przypadku wrażliwych układów czy organizmów w czasie bioobrazowania.

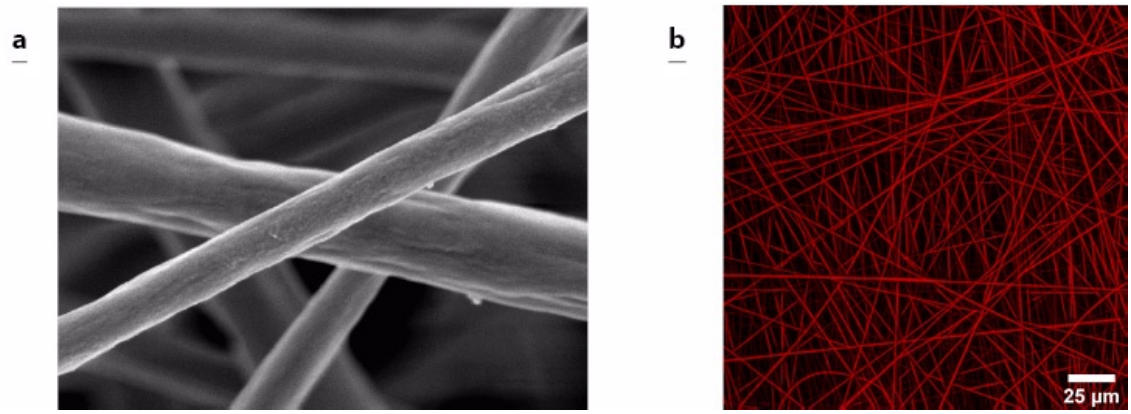
6.3.2
Nanowłókna jako sensory

Inną grupę nanostruktur, które zasadniczo mogą być wykorzystywane bez obecności podłoża, stanowią nanowłókna elektroprzędzione.

Nanowłókna polimerowe przygotowuje się z reguły w procesie elektroprzędzenia, w przypadku nanowłókien z innych materiałów, np. ceramicznych, po procesie przędzenia stosuje się inne etapy, np. spiekanie. Elektroprzędzenie wymaga uformowania z roztworu polimeru odpowiednio cienkiego strumienia, pod wpływem działania pola elektrycznego (znacznej różnicy potencjałów, rzędu tysięcy woltów), co stanowi pewne utrudnienie z eksperymentalnego punktu widzenia. Nanowłókna elektroprzędzione mogą być otrzymywane z mieszanin polimerów, mogą zawierać wbudowane nanocząstki, inne związki nadające pożądane właściwości w tym sensorowe, bioreceptory, wprowadzone albo w procesie syntezy, albo na kolejnych etapach wykorzystując wolną (niezablokowaną np. w wyniku obecności koloidu ochronnego, jak w przypadku

większości układów nanocząstek) powierzchnię nanowłókien. Otwiera to bardzo szerokie możliwości wykorzystania tego typu nanostruktur do konstrukcji sensorów.

Nanowłókna pod wieloma względami są unikatową grupą materiałów nanostrukturalnych, co czyni je atrakcyjnym materiałem do przygotowywania sensorów. Z powodów praktycznych trudno jest otrzymać i wykorzystać pojedyncze nanowłókno (o średnicy np. kilkudziesięciu nanometrów) w formie podobnej do nici, z reguły w procesie syntezy otrzymuje się włókno (nominalnie jedno) tworzące matę, czyli układ wzajemnie nakrywających się fragmentów włókna o rozmiarach makroskopowych, np. matę o średnicy 10 cm (rys. 6.17). Tego typu struktury nie mogą być rozważane jako nanostruktury zdyspergowane w takim znaczeniu, jak dotyczyło to nanocząstek, jednak ze względu na obecność porów w strukturze maty nie jest ona również warstwą w znaczeniu takim, jak np. warstwa z nanorurek węglowych. Porowata struktura maty nanowłókien jest więc, z punktu widzenia wykorzystania tego typu układów jako sensorów, układem pośrednim między zawiesiną nanocząstek a warstwą – membraną. Znaczna porowatość maty z nanowłókien, szczególne właściwości nanowłókien wynikające wprost z geometrii nanostruktury, możliwości stosowania w nieobecności warstwy podłoża, są atrakcyjne z punktu widzenia wykorzystania tych układów w analizie chemicznej. Należy podkreślić, iż w odróżnieniu od nanocząstek, wykorzystanie nanowłókien jako sensorów jest znacznie słabiej reprezentowane w literaturze [26].



RYS. 6.17

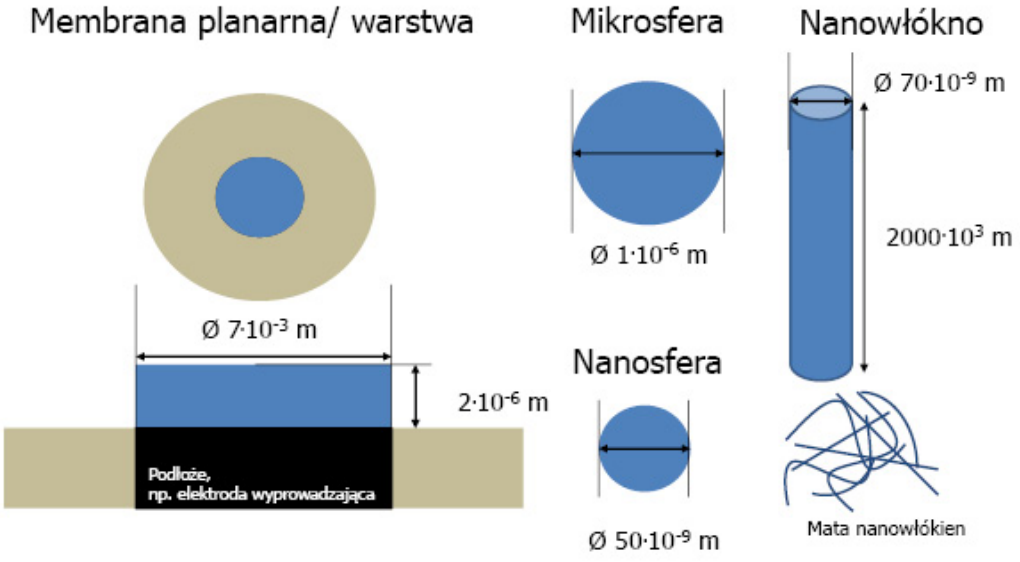
Zdjęcie maty z nanowłókien otrzymanej przez dr J. Kalisz i dr A. Kisiel: a) wykonane metodą skaningowej mikroskopii elektronowej – fot. dr O. Syta, b) w mikroskopie konfokalnym dla nanowłókien zawierających barwnik fluorescencyjny – fot. dr B. Paterczyk

Nanowłókna elektroprzędzione, są typowo materiałem o średnicy nanometrycznej, jednak ich długość nie jest ograniczona do skali nano- czy mikrometrów i może być znaczna, nawet w skali makro. Maty z nanowłókien mogą być otrzymane z bezwzględnie dużej ilości materiału (np. polimeru), ciągle oferując zalety nanoskali. Proces syntezy nie wymaga stosowania koloidów ochronnych, tak więc powierzchnia otrzymanych struktur jest wolna od obecności trwale związanych odczynników, matę nanowłókien (w odróżnieniu od nanosfer) można wielokrotnie zanurzać i usuwać z próbki. Matę można również otrzymać z nanowłókien o różnych właściwościach, potencjalnie mogących pełnić funkcję różnych czujników. Taka mata może też stanowić w praktyce zestaw sensorów.

6.3.3
Specyfika transportu analitu do

sensorów nanostrukturalnych

Wykorzystanie mikro- i nanostruktur, czy nanowłókien jako samodzielnych sensorów związane jest z różnymi efektami, ważnymi z punktu widzenia analitycznego. Istotną zaletą wykorzystania układów zdyspergowanych jest korzystny stosunek powierzchni do objętości – typowy dla układów mikro- czy nanostrukturalnych. W przypadku warstw (w tym także warstw otrzymanych z nanostruktur) transport analitu/ reagenta do wnętrza warstwy (i reakcja w objętości) jest zwykle ograniczony w pewnym stopniu: wymianą i inkorporowaniem reagenta – reakcja zachodzi przede wszystkim na powierzchni warstwy. Podobnie dzieje się w przypadku mikro- czy nanostruktur, jednak zasadnicza różnica związana jest ze stosunkiem pola powierzchni do objętości obu rozważanych układów, co ma istotne znaczenie dla działania sensora (rys. 6.18).



RYS. 6.18

Porównanie geometrii różnych układów warstwy – membrany planarnej, mikrosfery i nanosfery oraz nanowłókna, na rysunku podano przykładowe,

typowe wymiary rozważanych struktur, dla uproszczenia przyjęto, że nanowłókno ma objętość całkowitą taką jak membrana planarna

Rozważania zależności objętości i pola powierzchni membrany planarnej (warstwy, w tym także warstwy mikro- czy nanostruktur) i mikrosfery, czy nanowłókna dla wybranych podanych przykładowych wymiarów przedstawiono na rys. 6.18 i w tabeli 6.2. Dla kuli (sfery) stosunek pola powierzchni bocznej do objętości jest odwrotnie proporcjonalny do promienia sfery (tabela 6.2) i jest stały dla danej objętości sfery. Aby zwiększyć wartość stosunku pola powierzchni do objętości sfery, należy zmniejszyć objętość sfery – przejść od sfer do mikrosfer czy nawet nanosfer. W przypadku przedstawionym na rys. 6. 18, stosunek pola powierzchni do objętości jest w przypadku mikrosfery około 1200 razy większy niż dla warstwy. W przypadku nanosfer, różnice te będą jeszcze większe na korzyść nanostruktur. Warto podkreślić, że w podanym przykładzie, aby wykorzystać w postaci drobin ilość materiału równorzędną objętości membrany, należy użyć ok. $1{,}5 \cdot 10^{10}$ mikrosfer.

Unikatową cechą nanowłókien jest możliwość otrzymania włókna o teoretycznie nieskończonej długości z zachowaniem nanometrycznej średnicy. Wykorzystanie objętości materiału odpowiadającej przykładowej membranie planarnej przedstawionej na rys. 6.18 w formie nanowłókien o średnicy 70 nm wymaga otrzymania nanowłókna o długości 2000 km. Powierzchnia boczna tak otrzymanego nanowłókna będzie ok. $1{,}5 \cdot 10^{4}$ razy większa od powierzchni membrany planarnej. Dodatkowo wykorzystanie nanowłókien pozwala na otrzymanie nanostruktur o różnym stosunku pola powierzchni bocznej do objętości poprzez zmianę

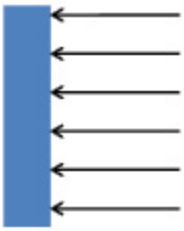
średnicy nanowłókna nawet w znacznym zakresie, z zachowaniem stałej objętości układu nanostrukturalnego (tabela 6.2).

Powyższe porównania objętości i pola powierzchni różnych układów mają istotne konsekwencje dla wykorzystania mikro- i nanostruktur jako sensorów. Wykorzystanie układów mikro- czy nanosfer jest szczególnie korzystne w przypadku reakcji/procesów zachodzących na granicy faz próbka/sensor, np. mikro- czy nanocząstka. Modyfikacja powierzchni, wykorzystanie reakcji zachodzącej w ograniczonej objętości na granicy faz – nanostruktura – próbka, jest szczególnie korzystne dla zastosowań analitycznych w przypadku nanostruktur. Pozwala na wprowadzenie znacznych ilości związków modyfikujących z wykorzystaniem stosunkowo małej objętości sensora, dodatkowo wykorzystanie różnych materiałów w formie mikro- czy nanostruktur pozwala na wykorzystanie ich specyficznych właściwości do efektywnego modyfikowania powierzchni reagentami. W przypadku sensorów wymagających reakcji przebiegającej w całej objętości warstwy receptorowej, zastosowanie takich układów jest również korzystne. Nawet w przypadku materiałów polimerowych o bardzo niskich współczynnikach dyfuzji nanometryczny rozmiar struktury, tj. stosunkowo krótka droga analitu w warstwie receptorowej w porównaniu z membraną planarną, pozwala na znaczne skrócenie czasu odpowiedzi sensora.

Powyższy efekt jest również zależny od transportu analitu do sensora w roztworze próbki (rys. 6.19). Układy planarne i układy sferyczne charakteryzują się odmienną dyfuzją analitu obecnego w roztworze do warstwy receptorowej sensora. Dla układów planarnych strumień analitu, *J*, związany z transportem

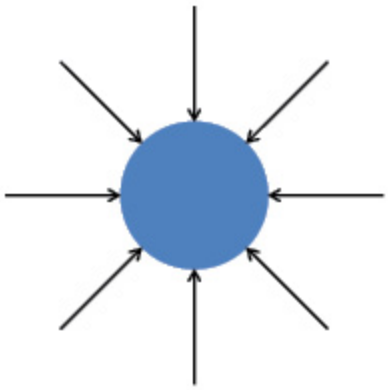
samorzutnym z roztworu zależy od stężenia analitu w roztworze i zmniejsza się wraz z upływem czasu – dominuje dyfuzja liniowa. Efekt ten może prowadzić do wyczerpania się analitu przy powierzchni sensora, a w konsekwencji o czasie odpowiedzi sensora decyduje transport analitu w roztworze. W przypadku zdyspergowanych układów mikro- czy nanostrukturalnych (mikrosfer, nanosfer) dominuje dyfuzja sferyczna, strumień analitu, transportowanego samorzutnie z roztworu do sensora, *J*, początkowo maleje w czasie, podobnie jak dla warstwy planarnej, jednak wraz z upływem czasu decyduje drugi człon równania przedstawionego na rys. 6.19, który nie zależy od czasu. Dla mikrosfery o średnicy 1 μm po około 100 s strumień analitu przestaje zależeć od czasu. W konsekwencji transport analitu nie zależy od czasu (po przekroczeniu pewnej wartości) analit jest w sposób ciągły transportowany do nano- czy mikrosensora.

Membrana planarna



$$J = c \times \sqrt{\frac{D}{\pi t}}$$

Mikrosfera / nanosfera



$$J = c \times \sqrt{\frac{D}{\pi t}} + \frac{D \times c}{r}$$

RYS. 6.19

Schematyczne porównanie dyfuzji analitu do membrany planarnej i do mikro- czy nanosfery o promieniu *r* oraz wyrażenia na strumień analitu, *J* (mol·cm^{-2}·s^{-1}), gdzie *D* jest współczynnikiem dyfuzji analitu w roztworze (cm^{2}·s^{-1}), *c* jest stężeniem analitu w roztworze (mol·cm^{-3}) i *t* oznacza czas (s)

W układach rzeczywistych dodatkowo sensor w postaci warstwy planarnej pozostaje zwykle nieruchomy w roztworze próbki (która może być mieszana, może płynąć i omywać sensor, co wspomaga transport analitu). Z kolei układy zdyspergowane zwykle pozostają w ciągłym ruchu w próbce (ruchy Browna). Mieszanie próbki, konwekcja, sprzyja równomiernemu dystrybuowaniu nanosensorów w całej objętości próbki. W pewnych warunkach możliwe jest ukierunkowanie ruchu nanosensorów w stacjonarnej fazie próbki, np. poprzez stosowanie układów zawierających rdzeń magnetyczny można sterować ruchem nanostruktur poprzez odpowiednie zmienianie pola magnetycznego w próbce, czy też zgromadzić nanosensory tego typu w zadanej objętości/ miejscu próbki (np. oddzielenia od próbki, rejestracji sygnału, ponownego zdyspergowania).

W przypadku nanowłókien rozważania dotyczące transportu analitu do warstwy są bardziej złożone. Z jednej strony matę można traktować jako całość, powierzchnię, do której analit dociera na drodze dyfuzji liniowej. Z drugiej strony, rozpatrując pojedyncze włókna można mówić o dyfuzji cylindrycznej, jednak z zastrzeżeniem, że warstwy dyfuzyjne (dla różnych włókien) się nakładają. W rezultacie geometria dyfuzji w takim układzie może być różna, w zależności od porowatości/stopnia upakowania włókien w macie.

6.3.4
Nano- i mikrosensory z różnych materiałów – otrzymywanie i właściwości

Nano- i mikro cząstki często otrzymuje się w reakcji syntezy bezpośrednio w roztworze, najczęściej w obecności koloidu ochronnego. W przypadku mikro- czy nanocząstek polimerowych – syntezę przeprowadza się poprzez polimeryzację w ograniczonej objętości fazy organicznej zawieszonej w roztworze wodnym, poprzez nanostrącanie polimeru w fazie wodnej związane z odparowaniem lub oddyfundowaniem rozpuszczalnika. W przypadku kropek kwantowych, nanocząstek magnetycznych, nanocząstek metali, proces otrzymywania prowadzi się poprzez krystalizację, strącanie czy redukcję zachodzącą w drobinach reagentów rozproszonych/zawieszonych w roztworze wodnym pod wpływem dodawanego odczynnika. Na kolejnych etapach otrzymane nanostruktury są oddzielane od mieszaniny reakcyjnej, poprzez wielokrotne wirowanie, dializę, a także są ponownie dyspergowane w roztworze. Podkreślić należy, że substancje obecne w czasie syntezy nanostruktur, np. stosowany koloid ochronny, najczęściej pozostają na jej powierzchni także podczas zastosowań analitycznych. Substancje istotne dla działania nano- czy mikrostrukturalnego sensora są albo dodawane do mieszaniny reakcyjnej podczas syntezy, albo otrzymane struktury są modyfikowane już po otrzymaniu. Wybór trybu postępowania zależy od właściwości materiału mikro- czy nanocząstek, ale także

wybranych substancji i ich właściwości: powinowactwa/zgodności z materiałem struktur, odporności na warunki syntezy.

TABELA 6.2
Stosunek powierzchni do objętości dla różnych struktur wykorzystywanych jako sensory

	Wyrażenie opisujące stosunek powierzchni do objętości
Sfera – kula, o promieniu *r*	$\frac{3}{r}$
Nanowłókno – walec, o promieniu podstawy *R*, wysokości *h* (uwzględniono tylko powierzchnię boczną), dla nanowłókien *R* << *h*	$\frac{2}{R}$

Nano- czy mikrostrukturalne sensory optyczne mogą charakteryzować się wzrostem sygnału dla wzrostu stężenia anlitu (*turn-on sensors*) lub też wygaszaniem sygnału dla wzrostu stężenia analitu (*turn-off sensors*). W przypadku sensorów, które w zamierzeniu mają posłużyć do śledzenia zmian stężenia analitów w próbkach rzeczywistych szczególnie korzystne wydaje się wykorzystanie sensorów, w przypadku których rejestrowany sygnał rośnie ze wzrostem stężenia oznaczanej substancji, idealnie specyficznie tylko w przypadku wzrostu stężenia analitu, w praktyce przynajmniej ze znaczną selektywnością.

6.3.5
Nano- i mikrosensory – zastosowania

W ogólności zastosowania analityczne sensorów – układów zdyspergowanych mogą być różne, są wykorzystywane rozmaite

materiały w formie mikro i nanostruktur – metale, półprzewodniki (kropki kwantowe), materiały krzemionkowe, polimery (rozumiane tu szeroko jako pochodne węglowodorów), nanostrukturalne materiały węglowe (węglowe kropki kwantowe). Z uwagi na znaczną różnorodność materiałów, z jakich wykonywane są sensory w formie mikro i nanosfer, różnią się znacznie zarówno procedury ich syntezy, jak i modyfikacji w celu uzyskania pożądanych, dla danych zastosowań, parametrów analitycznych. W zależności od wykorzystywanego materiału otrzymane nanostruktury charakteryzują się różnymi właściwościami optycznymi, wymagają wprowadzenia chromoforu lub same wykazują emisję, o widmie zależnym np. od reakcji zachodzących na powierzchni nanostruktury jak w przypadku nanostruktur metalicznych czy kropek kwantowych, ale także np. wymagających dyfuzji analitu do wnętrza sfery i reakcji w drobinie, jak w przypadku układów polimerowych: sfer czy kapsułek.

Opisywane powyżej kropki kwantowe – nanostruktury półprzewodnikowe, mają unikatowe właściwości z punktu widzenia analizy optycznej, szczególnie wykorzystującej emisję światła. Do istotnych zalet kropek kwantowych należą między innymi: wysoka wydajność kwantowa, wysokie wartości molowego współczynnika absorpcji, znaczna odporność na zmianę właściwości optycznych pod wpływem działania światła (*photobleaching*). Ponadto dość łatwo można otrzymać kropki kwantowe o rożnych widmach emisji, o różnych barwach. Kropki kwantowe wykorzystywano między innymi do immunofluorescencyjnego znakowania komórek czy tkanek, umożliwiając np. wizualizację komórek w warunkach ciągłego naświetlania, czy też uzyskanie obrazów o różnej barwie

odpowiadającej różnym stężeniom analitu, czy obecności różnych analitów. W przypadku kropek kwantowych czy nanocząstek metali modyfikacja powierzchni polega często na wykorzystaniu względnie małych cząsteczek – ligandów wiążących się bezpośrednio na powierzchni nanocząstek. Powierzchnie kropek kwantowych można np. zmodyfikować biotynowanymi peptydami, co pozwala na zobrazowanie błon komórkowych zawierających ugrupowania streptawidynowe [27]. Kropki kwantowe wykorzystywane są nie tylko jako zamienniki klasycznych barwników organicznych oferujące lepsze właściwości optyczne, ale także jako platformy służące do opracowywania nowych nanostrukturalnych układów analitycznych. Pewną przeszkodą w wykorzystaniu kropek kwantowych jako samodzielnych biosensorów jest trudność we wprowadzaniu kropek kwantowych do cytoplazmy czy do komórek, oraz potencjalnie wysoka toksyczność nanostruktur tego typu, związana z ryzykiem uwalnianiem tworzących je jonów metali ciężkich (np. kadmu czy selenu) [28].

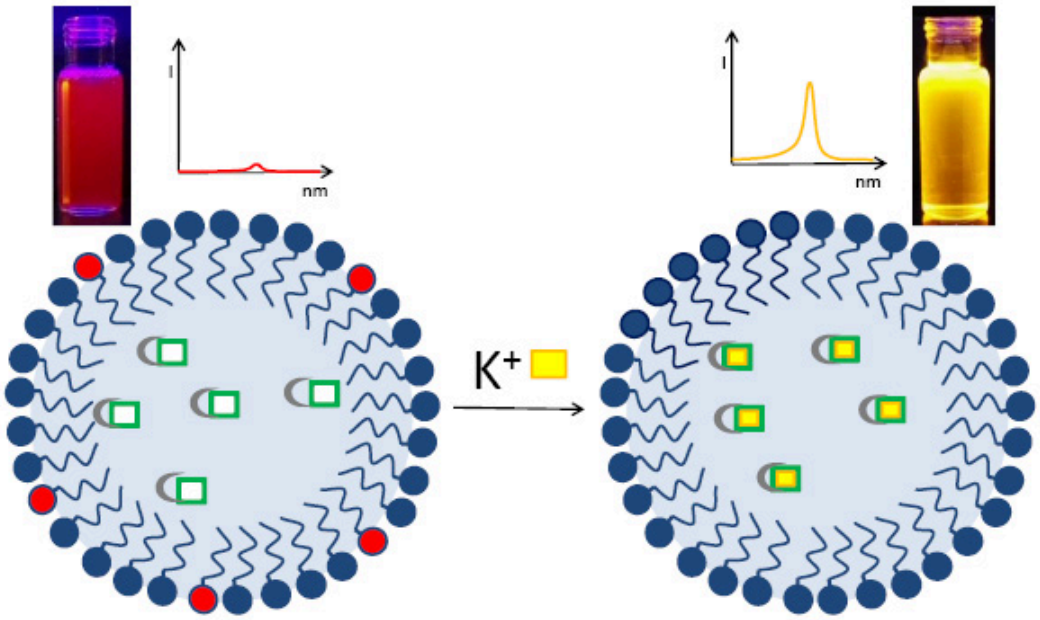
Nanocząstki metali, np. złota, wykazują znacznie niższą cytotoksyczność niż kropki kwantowe, mogą być otrzymywane w różnych kształtach (nie tylko sferycznych) i mogą być stosunkowo łatwo wprowadzane do żywych komórek. Powyższe właściwości, jak również występowanie efektów plazmonowych emisji, czyni nanocząstki złota interesującym materiałem na sensory mogące pracować w warunkach *in vivo* [27]. Podobnie jak kropki kwantowe, nanocząstki metali szlachetnych mogą w wyniku modyfikacji powierzchniowej stać się nośnikiem dla różnych receptorów biologicznych, tworząc złożone układy optycznie czułych

biosensorów [29], czy też tylko ułatwiające wnikanie barwnika modyfikującego do komórek [30].

Wykorzystanie zdyspergowanych nanocząstek krzemionkowych jako sensorów niesie szereg korzyści szczególnie z uwagi na mechaniczną trwałość, stabilność w zawiesinie, ponadto nanocząstki krzemionkowe są przezroczyste, co pozwala wprowadzać fluorofory, zarówno proste związki, np. pochodne rodaminy, jak i bardziej złożone układy do ich wnętrza. Właściwości nanostruktur krzemionkowych pozwalają również na modyfikowanie powierzchni wybranymi związkami barwnymi, jednym lub więcej, jeśli opracowywany sensor ma pracować w trybie pomiaru stosunku intensywności barwnika reagującego z analitem i barwnika odniesienia (*ratiometric sensor*) [31]. Jako sensory optyczne można również wykorzystywać nanocząstki typu rdzeń–powłoka (*core-shell*). Jednym z obiecujących rozwiązań jest np. pokrycie powierzchni kropek kwantowych warstwą powłoki krzemionkowej, co zmniejsza ryzyko uwalniania jonów metali ciężkich z kropki kwantowej. Innym rozwiązaniem jest pokrycie rdzenia krzemionkowego warstwą metalu, co może być istotne z punktu widzenia modyfikacji nanostruktur wybranymi związkami receptorowymi. Możliwe jest również otrzymanie nanostruktur o rdzeniu metalicznym powleczonym powłoką krzemionkową. Jeszcze innym rozwiązaniem jest przygotowanie np. nanokapsułek krzemionkowych, które pod wpływem bodźca – ultradźwięków – ulegają skruszeniu. Wydaje się, że zainteresowanie badawcze z jednej strony nanomateriałami: ich syntezą, a także możliwością wpływania na ich właściwości, m.in. przez tworzenie nanoukładów kompozytowych o różnej architekturze będzie owocować jeszcze

przez wiele lat propozycjami różnych sensorów: wykorzystujących różne materiały i różne sposoby detekcji optycznej, oferujących unikalne możliwości analityczne.

Kolejną bardzo szeroką grupą materiałów wykorzystywanych do otrzymywania sensorów mikro- i nanostrukturalnych są materiały organiczne, materiały polimerowe – o znacznym udziale szkieletu węglowodorowego. Nanostruktury polimerowe, poza wyjątkami, nie są aktywne optycznie, a otrzymane struktury służą jako nośniki dla wprowadzonych związków optycznie czułych. Optyczne sensory tego typu można podzielić na dwie grupy: (i) sensory zawierające barwnik/cząsteczkę optycznie aktywną reagującą zmianą widma na obecność analitu oraz (ii) sensory zawierające nieaktywny optycznie ligand wiążący analit i związek będący przetwornikiem optycznym. Sensory typu (i) mogą zawierać w drobinie polimerowej i/lub na jej powierzchni, np. związek czuły na zmianę pH (fluoresceinę), zmianę stężenia tlenu cząsteczkowego, czy też kationów takich jak Ca^{2+} [32], H^{+}, Mg^{2+}; albo barwnik polimerowy ulegający rozpuszczeniu prowadzącemu do zmiany emisji w obecności nawet bardzo niewielkich (kilka ppm) ilości cieczy organicznej w próbce. Sensory typu (ii) wykorzystują wysoce selektywne, optycznie nieaktywne, jonofory opracowane z myślą o wykorzystaniu w sensorach potencjometrycznych, w obecności barwnika pH czułego czy innego przetwornika optycznego: polimeru z grupy politiofenów (rys. 6.20), barwnika solwatochromowego. Sensory typu (ii) działają na zasadzie konkurencyjnego wiązania jonu analitu, np. Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, w drobinie polimerowej, co wymusza przemianę chemiczną przetwornika optycznego dla zachowania elektroobojętności drobiny polimerowej, dając mierzalną zmianę widma optycznego.



RYS. 6.20

Schemat ideowy działania jonoselektywnej optody wykorzystującej jako przetwornik optyczny politiofen [33]. Przedrukowano za zgodą © 2016 American Chemical Society

Jednym z przykładów praktycznego wykorzystania sfer zawieszonych w roztworze jako sensorów są testy aglutynacji. Testy aglutynacji, nazywane są czasem testami lateksowymi, ponieważ zawiesina mikrosfer polimerowych bywa określana nazwą lateks, wykorzystują selektywne, dzięki zastosowaniu bioreceptorów, zlepianie się cząstek zawieszonych w roztworze z wytworzeniem łatwo widocznej zawiesiny – aglutynację. Testy takie są wykorzystywane w praktyce klinicznej w przesiewowych badaniach na obecność określonych czynników w próbkach klinicznych, np. markerów chorób. W tym zastosowaniu, drobiny polimerowe, najczęściej polistyrenowe, służą jako nośnik po połączeniu z wybranymi przeciwciałami. W obecności antygenu w próbce, np.

surowicy krwi, sfery łączą się ze sobą – ulegają aglutynacji. Ocena testu może być prowadzona wizualnie lub też z wykorzystaniem np. metody turbidymetrycznej. Typowymi zastosowaniami testów aglutynacji jest określanie grup krwi.

Literatura

1. Chattopadhyay J., Srivastava R., *Advanced Nanomaterials in Biomedical, Sensor and Energy Applications*, Springer Nature, Singapore 2017.
2. Aversa R., Modarres H.M., Cozzini S., Ciancio R., Chiusole A., „Data Descriptor: The first annotated set of scanning electron microscopy images for nanoscience", *Sci. Data*, 2018, **5**, 180172.
3. Ghosh D., Sarkar K., Devi P., Kim K-H., Kumar P., „Current and future perspectives of carbon and graphene quantum dots: From synthesis to strategy for building optoelectronic and energy devices", *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 2021, **135**, 110391.
4. Anaya-Plaza E., Shaukat A., Lehtonen I., Kostiainen M.A., „Biomolecule-Directed Carbon Nanotube Self-Assembly", *Adv. Healthc. Mater.*, 2021, **10**, 2001162.
5. Yang G., Li L., Lee W.B., Ng M.C., „Structure of graphene and its disorders: a review", *STAM*, 2018, **19**, 613–648.
6. Szuplewska A., Kulpińska D., Dybko A., Chudy M., Jastrzębska A.M., Olszyna A., Brzózka Z., „Future Applications of MXenes in Biotechnology, Nanomedicine, and Sensors", *Trends Biotechnol.*, 2020, **38**, 264–279.
7. Dubey N., Bentini N., Islam I., Cao T., Neto A., Rosa V., „Graphene: A Versatile Carbon-Based Material for Bone Tissue Engineering", *Stem Cells Int.*, 2015, **2015**, 804213.
8. Arduini F., Cinti S., Scognamiglio V., Moscone D., „Nanomaterial-based sensors" w: *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry*, Elsevier, 2020, s. 329–359.

9. Fernández H., Arévalo F.J., Granero A.M., Robledo S.N., Nieto C., Riberi W.I., Zon M.A., „Electrochemical Biosensors for the Determination of Toxic Substances Related to Food Safety Developed in South America: Mycotoxins and Herbicides", *Chemosensors*, 2017, **5**, 23.

10. Yin T., Qin W., „Applications of nanomaterials in potentiometric sensors", *Trends Analyt. Chem.*, 2013, **51**, 79–86.

11. Meng Z., Stolz R.M., Mendecki L., Mirica K.A., „Electrically-Transduced Chemical Sensors Based on Two-Dimensional Nanomaterials", *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 478−598.

12. Jeerapan I., Sonsaard T., Nacapricha D., „Applying Nanomaterials to Modern Biomedical Electrochemical Detection of Metabolites, Electrolytes, and Pathogens", *Chemosensors*, 2020, **8**, 71.

13. Salihoglu O., Balci S., Kocabas C., „Plasmon-polaritons on graphene-metal surface and their use in biosensors", *Appl. Phys. Lett.*, 2012, **100**, 213110.

14. Wang L., Wan X-M., Gao R., Lu D-F., Qi Z-M., „Nanoporous Gold Films Prepared by a Combination of Sputtering and Dealloying for Trace Detection of Benzo[a]pyrene Based on Surface Plasmon Resonance Spectroscopy", *Sensors*, 2017, **17**, 1255.

15. Jatschka J., Dathe A., Csáki A., Fritzsche W., Stranik O., „Propagating and localized surface plasmon resonance sensing – A critical comparison based on measurements and theory", *Sens. Biosensing Res.*, 2016, **7**, 62–70.

16. Cai Z., Hu Y., Sun Y., Gu Q., Wu P., Cai C., Yan Z., „Plasmonic SERS Biosensor Based on Multibranched Gold Nanoparticles Embedded in Polydimethylsiloxane for Quantification of Hematin in Human Erythrocytes", *Anal. Chem.*, 2021, **93**, 1025−1032.

17. Lei J., Ju H., *Signal Amplification Using Nanomaterials for Biosensing, w Applications of Nanomaterials in Sensors and Diagnostics*, red. Tuantranont A., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2013.

18. Ju H., „Functional nanomaterials and nanoprobes for amplified biosensing", *Appl. Mater. Today*, 2018, **10**, 51–71.

19. Wang J., „Nanoparticle-based electrochemical bioassays of proteins", *Electroanalysis*, 2007, **19**, 769–776.

20. Benito-Peña E., Valdés M., Glahn-Martínez B., Moreno-Bondi M.C., „Fluorescence based fiber optic and planar waveguide biosensors. A review", *Anal. Chim. Acta*, 2016, **943**, 17–40.

21. Zeng S., Baillargeat D., Hod H-P. Yong K-T., „Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications", *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 3426–3452.

22. Wang X., Guo W., Hu Y., Wu J., Wei H., „Nanozymes: Next Wave of Artificial Enzymes", Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2016.

23. Shi X., Gu W., Li B., Chen N., Zhao K., Xian Y., „Enzymatic biosensors based on the use of metal oxide nanoparticles", *Microchim. Acta*, 2014, **181**, 1–22.

24. Yu Z., Tang Y., Cai G., Ren R., Tang D., „Paper Electrode-Based Flexible Pressure Sensor for Point-of-Care Immunoassay with Digital Multimeter", *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 1222−1226.

25. Rocha-Santos T., „Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles", *Trends Analyt. Chem.*, 2014, **62**, 28–36.

26. Maksymiuk K., Michalska A., „Polymeric nanofiber-based ion-selective sensors", *Curr. Opin. Electrochem.*, 2020, **23**, 74–79.

27. Pinaud F., King D., Moore H.-P., Weiss S., „Bioactivation and Cell Targeting of Semiconductor CdSe/ZnS Nanocrystals with Phytochelatin-Related Peptides", *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 6115–6123.

28. Ruedas-Rama M.J., Walters J.D., Orte A., Hall E.A.H., „Fluorescent nanoparticles for intracellular sensing: a review", *Anal. Chim. Acta*, 2012, **751**, 1–23.

29. Prigodich A.E., Randeria P.S., Briley W.E., Kim N.J., Daniel W.L., Giljohann D.A., Mirkin C.A., „Multiplexed Nanoflares: mRNA Detection in Live Cells", *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 2062–2066.

30. Lee H.Y., Son H., Lim J.M., Oh J., Kang D., Han W.S., Jung J.H., „BODIPY-functionalized gold nanoparticles as a selective fluoro-chromogenic

chemosensor for imaging Cu^{2+} in living cells", *Analyst*, 2010, **135**, 2022–2027.

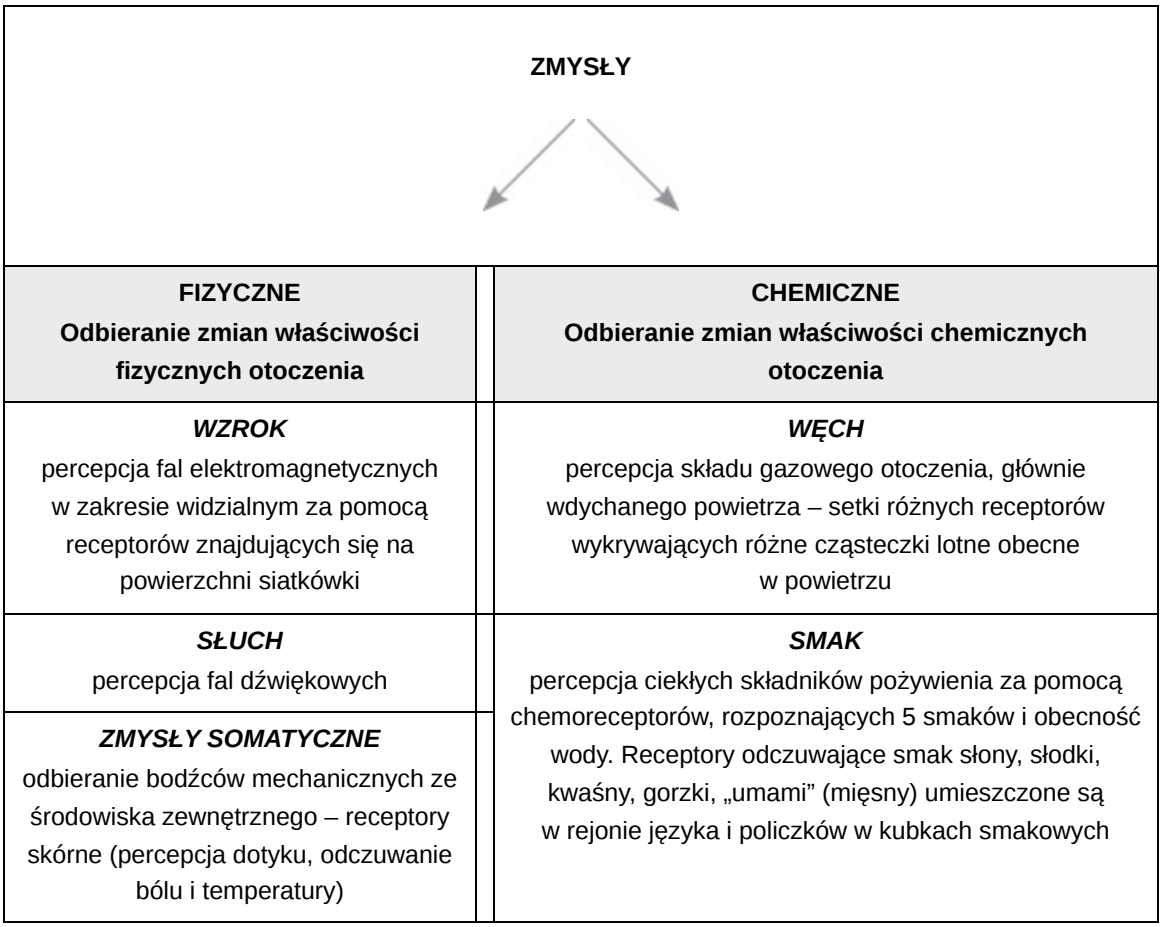
31. Wu S., Li Z., Han J., Han S., „Dual colored mesoporous silica nanoparticles with pH activable rhodamine-lactam for ratiometric sensing of lysosomal acidity", *Chem. Comm.*, 2011, **47**, 11276–11278.
32. Clark H.A., Hoyer M., Parus S., Philbert M.A., Kopelman R., „Optochemical nanosensors and subcellular applications in living cells", *Microchim. Acta*, 1999, **131**, 121–128.
33. Kłucińska K., Stelmach E., Kisiel A., Maksymiuk K., Michalska A., „Nanoparticles of Fluorescent Conjugated Polymers: Novel Ion-Selective Optodes", *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 5644−5648.

7

Układy multisensorowe – elektroniczny nos i język

Patrycja CIOSEK-SKIBIŃSKA

Każdy organizm do czerpania informacji z otoczenia potrzebuje wyspecjalizowanych i dalece skomplikowanych układów, służących do przyjmowania bodźców z otoczenia, do ich analizy i reagowania na nie, czyli zmysłów. Tradycyjnie u człowieka wyróżnia się zmysły fizyczne i chemiczne, których główną częścią są receptory, czyli wyspecjalizowane komórki wykształcone w kierunku reagowania na konkretny rodzaj bodźców (rys. 7.1).


ZMYSŁY
FIZYCZNE
Odbieranie zmian właściwości fizycznych otoczenia
CHEMICZNE
Odbieranie zmian właściwości chemicznych otoczenia
WZROK
percepcja fal elektromagnetycznych w zakresie widzialnym za pomocą receptorów znajdujących się na powierzchni siatkówki
WĘCH
percepcja składu gazowego otoczenia, głównie wdychanego powietrza – setki różnych receptorów wykrywających różne cząsteczki lotne obecne w powietrzu
SŁUCH
percepcja fal dźwiękowych
SMAK
percepcja ciekłych składników pożywienia za pomocą chemoreceptorów, rozpoznających 5 smaków i obecność wody. Receptory odczuwające smak słony, słodki, kwaśny, gorzki, „umami" (mięsny) umieszczone są w rejonie języka i policzków w kubkach smakowych
ZMYSŁY SOMATYCZNE
odbieranie bodźców mechanicznych ze środowiska zewnętrznego – receptory skórne (percepcja dotyku, odczuwanie bólu i temperatury)

RYS. 7.1
Rodzaje zmysłów biologicznych

Zmysły to nie tylko receptory, ale także poszczególne elementy układu nerwowego, pozwalające na transport, przetwarzanie oraz krótko- i długoterminową rejestrację informacji uzyskanej za ich pomocą.

Do tej pory opracowano wiele rozwiązań, które wspomagają bądź symulują narządy zmysłów. Niektóre sztuczne zmysły pojawiły się już w praktyce klinicznej (np. implant ślimakowy zastępujący uszkodzoną część ucha wewnętrznego), niektóre są wciąż testowane (implant korowy – neuroproteza wzroku). W przemyśle natomiast jest wykorzystywany tzw. *tactile sensor* (czujnik dotyku), który

umożliwia odczyt rozkładu ciśnienia przy równoczesnej możliwości odkształcania własnej powierzchni i elastycznego dopasowywania się do krzywizny powierzchni badanej (np. pomiar rozkładu ciśnienia w oponach samochodowych). W przyszłości urządzenie to będzie integralną częścią tzw. sztucznej skóry. Budową tych sztucznych narządów zajmuje się **BIONIKA** – nauka interdyscyplinarna znajdująca się na pograniczu techniki i biologii, zajmująca się badaniem, modelowaniem oraz symulacją funkcjonowania układów biologicznych. Narządy bioniczne są budowane z kilku różnych powodów:

- w celach teoretyczno-poznawczych (działanie modelowe);
- w celu integracji organów biologicznych i sztucznych (szerokie zastosowanie w nowoczesnej medycynie: biomateriały, implanty, endoprotezy, sztuczne serce, „inteligentne" protezy, stymulatory, itd.);
- w celu budowania systemów i urządzeń inżynierskich, zainspirowanych konstrukcją / mechanizmem / celem i zasadą działania układów biologicznych, jako układów doskonałych, powstałych w wyniku długotrwałej ewolucji (np. tekstylia, których budowa została zainspirowana budową struktury włókien roślinnych, sztuczna nerka, sztuczny język, membrany w przemyśle chemicznym naśladujące struktury błon biologicznych).

Rozwój dziedziny bionicznych zmysłów obejmuje głównie mimikę zmysłów fizycznych. Dzieje się tak głównie z powodu znacznie bardziej skomplikowanego działania zmysłów chemicznych – mimo szeregu prac mechanizmy rozpoznawania smaku i zapachu u organizmów wciąż w niewystarczającym stopniu są poznane.

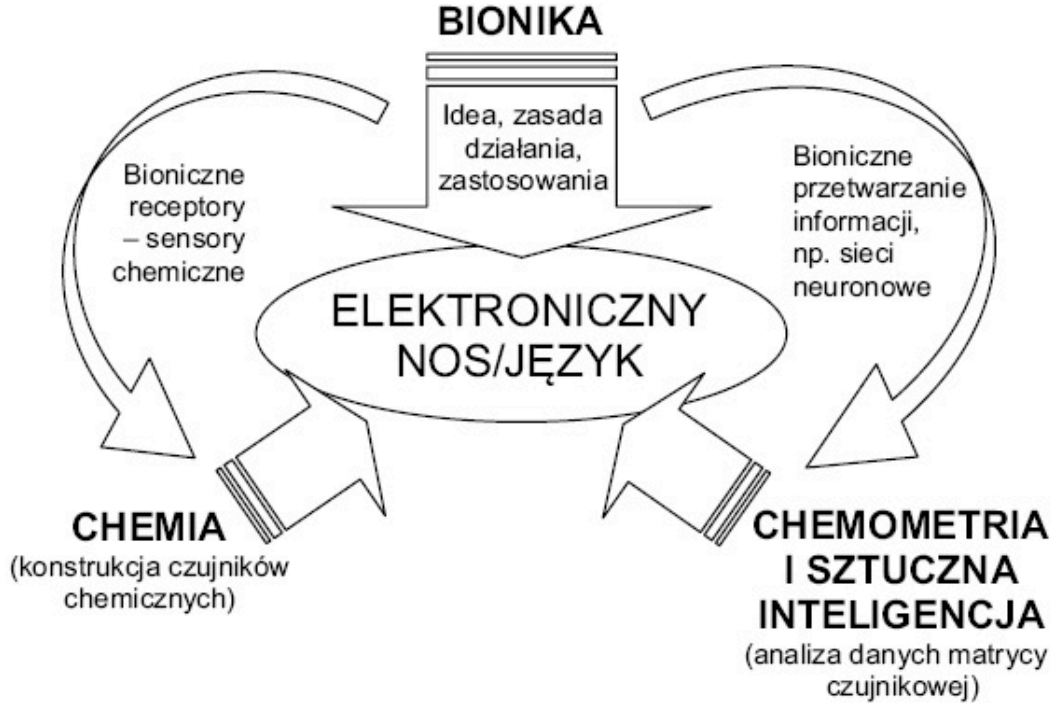
Wrażenia fizyczne są łatwo definiowalne za pomocą wielkości fizycznych, podczas gdy odczuwanie zmian składu chemicznego otoczenia wymaga uwzględnienia tysięcy różnych związków chemicznych. Dodatkowym problemem jest relacja pomiędzy strukturą cząsteczki i odczuwanym bodźcem węchowym lub smakowym – cząsteczki o podobnym kształcie mogą powodować zupełnie różne wrażenia (np. część węglowodanów jest słodka, część nie), natomiast różniące się znacznie pod względem budowy, grup funkcyjnych, mogą być odczuwane niemal tak samo (np. część węglowodanów ma słodki smak, który jest również odczuwalny w przypadku octanu ołowiu). Sprawy nie ułatwia fakt wspólnego oddziaływania kilku bodźców naraz i pojawiające się wówczas efekty synergiczne, addytywne, antagonistyczne, kompensacyjne czy maskujące. Następnym problemem jest duża ilość mechanizmów powstawania sygnału przy różnego rodzaju bodźcach chemicznych, w przeciwieństwie do bodźców fizycznych.

W ciągu ostatnich 35 lat podjęto jednak próby budowy systemów naśladujących zmysły chemiczne, co zostanie opisane w dalszej części tego rozdziału. Urządzenia te można zdefiniować następująco):

„Elektroniczny nos i elektroniczny język (w literaturze naukowej istniejące również pod synonimami: sztuczny nos, mechaniczny nos, sensor zapachu, sztuczny język, sensor smaku) są systemami, których budowa i zasada działania zostały zainspirowane neurofizjologią zmysłów węchu i smaku. Służą do automatycznej analizy i rozróżniania próbek o złożonym składzie, do rozpoznawania ich charakterystycznych właściwości i najczęściej przeznaczone są do szybkiej analizy jakościowej. Składają się z matrycy częściowo

selektywnych czujników chemicznych i zespołu metod numerycznych (bloku rozpoznawania obrazu), służących do analizy jej odpowiedzi" [1].

Systemy te zbudowane są z czujników chemicznych – urządzeń rutynowo wykorzystywanych w analizie chemicznej od wielu lat ze względu na szereg zalet: niski koszt, łatwość obsługi, możliwość pomiaru w czasie rzeczywistym i w trybie *on-line*. Budowa elektronicznych zmysłów nie wymaga jednak znajomości jedynie tematyki sensorowej, ale także technik i metod interpretacji uzyskiwanej za pomocą matrycy informacji. Analiza wielowymiarowych danych otrzymywanych podczas pomiaru jest przeprowadzana przy użyciu różnego rodzaju procedur matematycznych, chemometrycznych, statystycznych, z zakresu sztucznej inteligencji. Tak jak cały elektroniczny język/nos jest systemem bionicznym, tak poszczególne jego składowe mogą być też inspirowane bionicznie (rys. 7.2).



RYS. 7.2
Interdyscyplinarność tematyki dotyczącej elektronicznego języka/nosa [2]

7.1 Sensory stosowane w matrycach czujnikowych

Pierwsze urządzenia wykorzystujące matryce sensorów chemicznych w celu naśladowania zmysłów chemicznych pojawiły się w latach osiemdziesiątych XX wieku. Przeznaczone były do analizy próbek gazowych, a przez podobny do zmysłu węchu sposób działania nazwano je elektronicznymi nosami. W kolejnym dziesięcioleciu powstały urządzenia analogiczne, ale przeznaczone dla próbek ciekłych, w których początkowo skupiano się na określaniu poziomu smaków podstawowych, a następnie na rozpoznawaniu różnego rodzaju produktów spożywczych. Tak powstał sensor smaku oraz elektroniczny język.

Odczuwanie smaku i zapachu nie odbywa się dzięki pobudzaniu pojedynczych, konkretnych receptorów lub też nawet całych ich grup, ale w wyniku pobudzenia wielu receptorów w różnym stopniu. Dzięki temu możliwe jest powstanie charakterystycznego, unikalnego dla danej próbki „profilu”/”sygnatury”/”wzoru odpowiedzi”, rozpoznawanego przez struktury nerwowe. Czujniki stosowane w elektronicznych nosach i językach powinny działać analogicznie – reagować w różnym stopniu na różnorodne składniki mieszanin badanych, czyli charakteryzować się tzw. **selektywnością**

krzyżową/częściową. Ponadto, powinny być zorganizowane w matryce, czyli zespoły czujników, dzięki czemu powstający wielowymiarowy „profil" próbki jest dla niej charakterystyczny i unikalny, oraz można z niego wydobyć interesujące analityka informacje za pomocą różnorodnych procedur numerycznych. Ponadto czujniki tworzące matryce elektronicznego języka/nosa powinny charakteryzować się:

- niską granicą wykrywalności,
- wysoką stabilnością sygnału,
- wysoką powtarzalnością odpowiedzi,
- krótkim czasem odpowiedzi,
- krótkim czasem regeneracji,
- długim czasem życia,
- możliwością przeprowadzenia łatwej i szybkiej kalibracji.

W przypadku wielu zastosowań korzystna może być także zminiaturyzowana konstrukcja czujników, niskie zużycie energii, bezpieczeństwo użytkowania, a także niski koszt.

W związku z powyższymi warunkami najczęściej używanymi czujnikami w elektronicznych nosach są:

- sensory półprzewodnikowe (*metal oxide semiconductor*, MOS),
- sensory przewodnościowe z warstwą chemoczułą z polimerów przewodzących (*conducting polymer*, CP),
- czujniki gazów z kwarcową mikrowagą (*quartz crystal microbalance*, QMB),
- czujniki z powierzchniową falą akustyczną (*surface acoustic wave*, SAW),

natomiast w elektronicznych językach

- elektrody jonoselektywne (*ion-selective electrode*, ISE),
- czujniki amperometryczne/ogniwa woltamperometryczne (*amperometric/voltamperometric sensors*) oraz czujniki optyczne

Liczba czujników w matrycy zazwyczaj nie jest większa niż kilkanaście.

Sensory półprzewodnikowe typu MOS składają się z ceramicznego substratu, zatopionej w nim grzałki i filmu z półprzewodnikowego tlenku metalu o różnej grubości nano- do mikrometrycznej. W zależności od zastosowanego materiału półprzewodnikowego, sensor odpowiada na substancje o różnej aktywności redoks. Zwiększenie reaktywności z tymi substancjami otrzymuje się dzięki prowadzeniu pomiaru w podwyższonej temperaturze, powodującej wzrost bądź spadek ilości elektronów w paśmie przewodnictwa półprzewodnika (w temperaturze 200–650°C lotne związki organiczne obecne w mieszaninach gazowych zostają utlenione do ditlenku węgla i wody na powierzchni półprzewodnika, co prowadzi do zmiany jego rezystancji). Sterując temperaturą oraz rodzajem domieszkowania warstwy chemoczułej metalami szlachetnymi, możliwe jest uzyskanie czujników o zróżnicowanej selektywności krzyżowej. Czujniki typu MOS zostały wykorzystane w komercyjnym systemie FOX 2000, którego liczne zastosowania przedstawione zostały w literaturze naukowej. Przykładowo, urządzenie to potrafi rozpoznawać szczepy bakterii w posiewach agarowych i rodzaj patogennych bakterii obecnych w mięsie. Dzięki temu urządzeniu możliwe jest również rozróżnianie rodzajów mięsa, a także rozpoznanie producenta mleka na podstawie badania jego jakości. FOX 2000 użyty został także do kontroli kilku etapów wytwarzania piwa: od kontroli jakości słodu

używanego do produkcji piwa do identyfikacji nieprawidłowo przechowywanej i wytwarzanej brzeczki.

Działanie **czujników z warstwą polimeru przewodzącego (CP)** wykorzystuje, podobnie jak w czujnikach typu MOS, pomiar zmiany rezystancji warstwy chemoczułej powodowanej przez adsorpcję gazów. Czujniki te składają się z substratu (np. krzem), pary elektrod i filmu z przewodzącego polimeru (polipirole, polianilina, politiofeny). Przykładanie różnicy potencjału do warstwy tych materiałów powoduje przepływ prądu, którego wielkość zmienia się wraz z ilością związków lotnych zaadsorbowanych na powierzchni. Otrzymywanie czujników o zróżnicowanej selektywności wymaga dobrania rodzaju polimeru przewodzącego oraz parametrów jego osadzania elektrochemicznego na substracie. Czujniki CP wykazują odporność na zatrucie, niską temperaturę pracy oraz zazwyczaj stosunkowo wysoką czułość, jednak są wrażliwe na wilgotność. Ich krótki czas życia, wysoki koszt produkcji oraz mniejsza powtarzalność, sprawiają, że są one używane rzadziej niż czujniki MOS. Przykładem zastosowania czujników CP jest komercyjny elektroniczny nos Aromascan. Przykładową aplikacją tego systemu jest monitorowanie procesu warzenia piwa, szacowanie czasu przechowywania soków owocowych i stopnia ich zepsucia, a także wykrywanie źródła nieprzyjemnego zapachu w farmaceutykach.

Czujniki piezoelektryczne (SAW, QMB), wykorzystujące zjawisko piezoelektryczności, należą do grupy czujników masowych. Podstawową częścią tych sensorów są piezoelektryczne dyski kwarcowe pokryte materiałami (chromatograficzne fazy stacjonarne, lipidy) o zróżnicowanym powinowactwie chemicznym do różnych

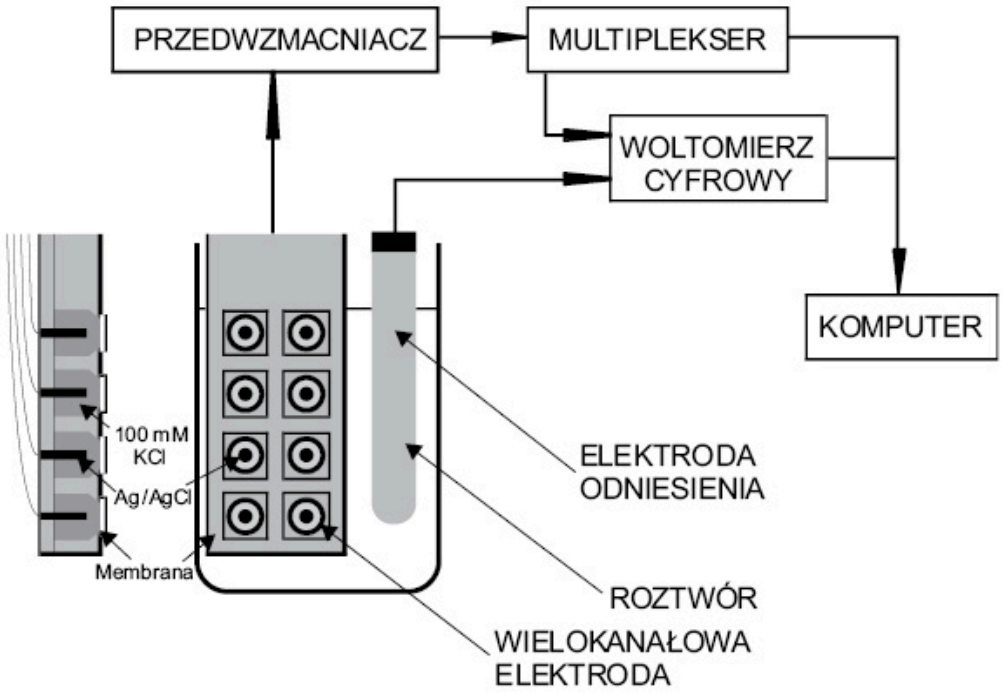
klas związków. Przykładanie zmiennego potencjału do piezoelektrycznego dysku powoduje jego drganie, przy czym częstotliwość drgań jest ściśle określona i stała. Pod wpływem adsorpcji związków lotnych zwiększa się masa warstwy chemoczułej, co powoduje zmianę częstotliwości drgań kryształu w 3 wymiarach w przypadku QMB i w 2 wymiarach w przypadku SAW. Sensory piezoelektryczne mogą być pokrywane różnorodnymi materiałami, dzięki czemu możliwe jest ścisłe kontrolowanie ich selektywności. Choć wykazują duży wpływ zmian wilgotności i temperatury na sygnał a ich technologia wytwarzania powoduje ich niewystarczającą powtarzalność, sensory QMB i SAW wchodzą w skład matryc wielu elektronicznych nosów. Przykładowo, czujniki QMB znalazły zastosowanie w matrycy czujnikowej komercyjnego LibraNose. Do budowy warstw chemoczułych wykorzystano w tym przypadku metaloporfiryny – związki makrocykliczne, których powinowactwo chemiczne do różnych analitów można modyfikować przez zmianę jonu centralnego i podstawników związanych z pierścieniem porfirynowym. Zdolności klasyfikacyjne LibraNose zostały potwierdzone podczas wielu badań: monitorowania procesu starzeniowego sera i do oceny zapachu gotowego produktu, do rozpoznawania rodzaju wina, mleka, owoców, liści tytoniu, jakości pomidorów oraz kontroli czasu przechowywania mięsa wołowego i ryb. LibraNose został również zastosowany w diagnostyce medycznej do wykrywania śladów krwi w moczu czy do diagnostyki raka płuc na podstawie powietrza wydychanego przez pacjenta.

Matryca sensorów stosowana w elektronicznym języku obejmuje najczęściej **sensory elektrochemiczne**. W wielu przypadkach podstawą działania elektronicznego języka jest pomiar

potencjometryczny, polegający na pomiarze siły elektromotorycznej (SEM) ogniwa składającego się z elektrody wskaźnikowej i elektrody odniesienia w warunkach bezprądowych. Zakładając stały potencjał elektrody odniesienia podczas pomiaru, SEM ogniwa jest proporcjonalna do potencjału elektrody wskaźnikowej, który jest efektem równowagi reakcji elektrochemicznej lub równowagi jonowej ustalającej się na granicy faz elektroda/roztwór. Potencjał ten określa równanie Nernsta – jest on funkcją aktywności oznaczanego jonu w roztworze.

W urządzeniach typu elektroniczny język najczęściej są stosowane membranowe elektrody jonoselektywne (**ISE**), dla których źródłem potencjału jest potencjał membranowy, wynikający z równowag jonowych ustalających się pomiędzy cienką warstwą roztworu badanego przylegającą do membrany a membraną elektrody, która zawiera składnik aktywny oddziaływujący z analitem. Spośród trzech rodzajów membran stosowanych w ISE (szklane, krystaliczne, ciekłe), najczęściej w matrycach czujnikowych są stosowane membrany ciekłe, w których związek elektroaktywny (wymieniacz jonowy, jonofor) jest rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym niemieszającym się z wodą – stałym roztworze polimeru, najczęściej poli(chlorku winylu), do którego dodawany jest plastyfikator. Na wypadkową selektywność membrany wpływa jonofor, zdolny do odwracalnego i selektywnego kompleksowania jonów, oraz jej charakter lipofilowy wynikający z jej pozostałych składników. Modyfikując skład membrany, tj. rodzaj jonoforu, soli lipofilowej, matrycy membranowej, otrzymujemy szereg możliwości wpływania na selektywność elektrod jonoselektywnych. Dodatkowe zalety tych sensorów, takie jak dobrze znane mechanizmy działania,

niski koszt, łatwość przygotowania membrany, nieskomplikowany układ pomiarowy, niewątpliwie przyczyniły się do wysokiej popularności tych czujników w matrycach elektronicznego języka. Sztandarowym tego przykładem jest komercyjny elektroniczny język – tzw. sensor smaku, *Taste Sensing System*. Jest to wielokanałowa elektroda, w której warstwy chemoczułe stanowią membrany lipidowo-polimerowe – w matrycy polimerowej z plastyfikowanego poli(chlorku winylu) zawieszone są różnego rodzaju lipidy (np. cholesterol, dekanol, kwas oleinowy) (rys. 7.3). Podobnie do warstw lipidowych w ścianach komórkowych kubków smakowych, postuluje się, że syntetyczne membrany lipidowe są zdolne do „odczuwania" 5 rodzajów smaków i dzięki temu mogą rozróżniać substancje na podstawie tej charakterystycznej dla nich właściwości.

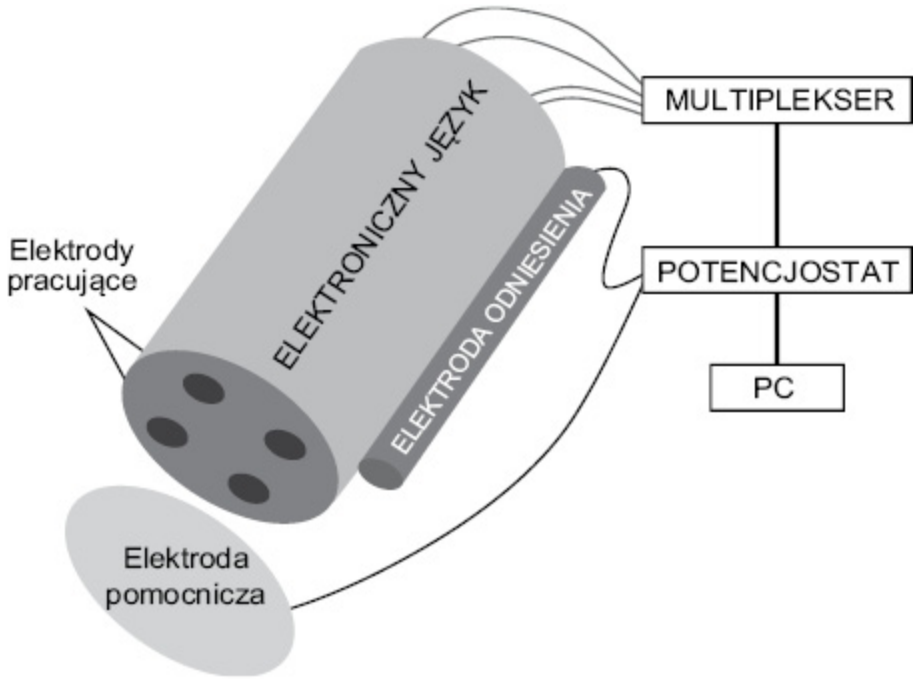


RYS. 7.3

Schemat „sensora smaku" [1]

Przedstawiono wiele zastosowań tego urządzenia: klasyfikację i kontrolę jakości produktów spożywczych o złożonym składzie, takich jak piwo, kawa, mleko, herbata, sake, pasta sojowa; określenie stopnia gorzkości wielu różnorodnych formulacji farmaceutycznych, opracowanie i optymalizację receptur farmaceutyków.

Matrycja czujnikowa **woltamperometrycznego elektronicznego języka** składa się z kilku elektrod pracujących z różnych metali (m.in. złoto, platyna, rod), chlorosrebrowej elektrody odniesienia i elektrody pomocniczej (rys. 7.4).



RYS. 7.4

Schemat budowy woltamperometrycznego elektronicznego języka [1]

Przepływ prądu pomiędzy elektrodą pomocniczą i elektrodą pracującą wywoływany jest przyłożeniem do nich różnicy potencjałów. Rejestrując natężenie prądu w funkcji przyłożonego

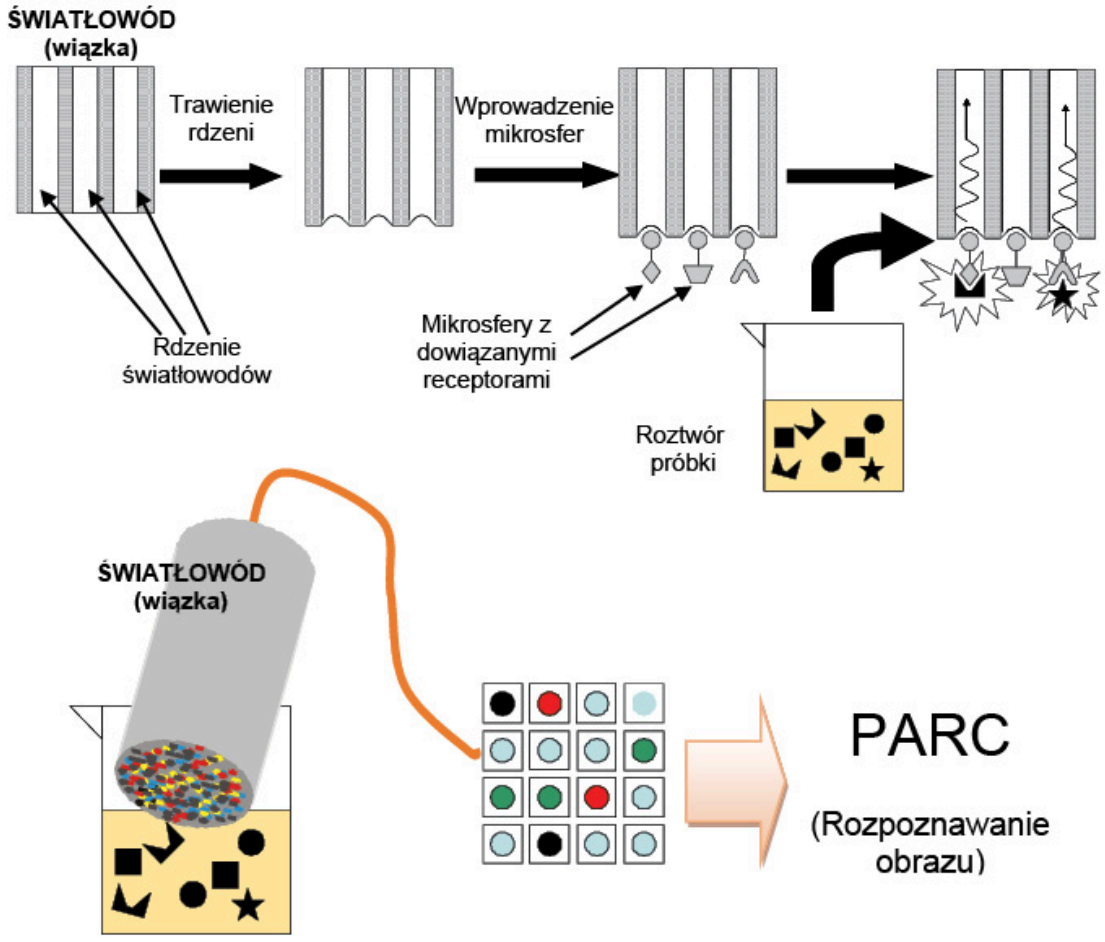
potencjału otrzymuje się woltamperogram, którego kształt determinują reakcje elektrodowe związków elektroaktywnych znajdujących się w badanej próbce. W przypadku mieszanin wieloskładnikowych woltamperogram nie jest łatwy do zinterpretowania, ponieważ występuje nakładanie się poszczególnych sygnałów, jednakże jest on wciąż charakterystycznym, unikalnym „profilem" danej próbki. Dzięki temu możliwe jest np. rozróżnienie soków owocowych, pochodzących od różnych producentów, a także odróżnienie soków naturalnych od napojów produkowanych z koncentratów owocowych. Zastosowanie takiego urządzenia umożliwia też monitoring kilkuetapowego oczyszczania wody w stacji uzdatniania oraz optymalizację parametrów pracy zmywarek do naczyń w zależności od rodzaju dostępnej wody.

Odrębną grupę matryc czujnikowych stanowią **optyczne elektroniczne języki**, wykorzystujące czujniki optyczne do pomiarów absorpcyjnych bądź fluorescencyjnych. Zamiast tradycyjnego nakładania membran chemoczułych na wiązki światłowodów, pojedyncze adresowane światłowody można pokrywać warstwą receptorową za pomocą fotopolimeryzacji. Inną możliwością jest wykorzystanie chemicznie modyfikowanych za pomocą receptorów mikrosfer, które umieszcza się we wnękach powstałych poprzez wytrawienie rdzenia światłowodu (rys. 7.5). W ten sposób wiązka utworzona przez wiele światłowodów staje się zintegrowanym elektronicznym językiem. Polimerowe mikrosfery z polistyrenu i glikolu polietylenowego oraz agarowe, które mają modyfikowaną powierzchnię, są materiałem dostępnym komercyjnie, umożliwiającym kowalencyjne związanie różnego rodzaju

indykatorów, receptorów, cząsteczek oddziaływujących specyficznie z różnymi analitami, wskaźników kolorymetrycznych, enzymów, przeciwciał. Dzięki tej właściwości optyczny elektroniczny język jest urządzeniem wysoce uniwersalnym. Przykładowo, za pomocą takiego urządzenia możliwy jest szereg zastosowań z dziedziny analizy biomedycznej. Badanie śliny umożliwia monitorowanie poziomu hormonów (np. testosteron, insulina, aldosteron), substancji leczniczych (np. cyklosporyny, diazepam, paracetamol, teofilina), wykrycie przeciwciał (np. HIV, wirusowe zapalenie wątroby) oraz innych białek, świadczących o patologicznym stanie organizmu (diagnostyka chorób genetycznych, autoimmunologicznych, nowotworów złośliwych, zakażeń *Helicobacter pylori*).

Odpowiednio modyfikowane mikrosfery mogą być umieszczane nie tylko w wytrawionych światłowodach, ale także mogą zostać zaimmobilizowane w strukturach krzemowych mających mikrokanały, w których przepływa roztwór próbki (system typu μ-TAS, *Micro-Total-Analysis-System*). Ze względu na fakt, że ruch cieczy występuje w nich pod wpływem sił kapilarnych, nie jest konieczne zastosowanie pompy perystaltycznej. Zmiana zabarwienia bądź intensywności fluorescencji powierzchni mikrosfer spowodowana kontaktem z analitem powoduje powstanie charakterystycznego wzoru, który jest rejestrowany za pomocą kamery CCD, a następnie analizowany za pomocą metod rozpoznawania obrazu (rys. 7.6). Urządzenie to wykorzystano do szacowania ryzyka chorób serca, wykrywania przeciwciał HIV, żółtaczki i grypy.

Do budowy matryc elektronicznych nosów i języków oprócz przedstawionych powyżej sensorów, są także proponowane inne typy czujników oraz inne urządzenia generujące „profile”/”odciski palca” charakterystyczne dla próbki (np. SPR, MS, GC). Coraz większą popularność zdobywają macierze receptorowe do detekcji i oznaczania wybranych analitów na podstawie „profilu odpowiedzi” zamiast typowego dla chemii analitycznej rozpoznawania za pomocą metody „zamka i klucza”. Projektowanie receptorów bywa wszak niepraktyczne w przypadku nie w pełni scharakteryzowanych analitów (na przykład wielu dużych cząsteczek biologicznych), a w przeciwnych przypadkach, w których można zaprojektować wysoce specyficzny receptor, wymagana synteza może być trudnym zadaniem. Nowym sposobem detekcji i oznaczania analitów, zainspirowanym i naśladującym naturalne zmysły smaku i węchu, a rozszerzająca zasadę działania elektronicznego nosa i języka, jest więc tzw. rozpoznawanie różnicowe (*differential sensing*), oparta na niespecyficznych receptorach o selektywności krzyżowej/różnicowej, mogących wchodzić w interakcję z wieloma składnikami próbek badanych.



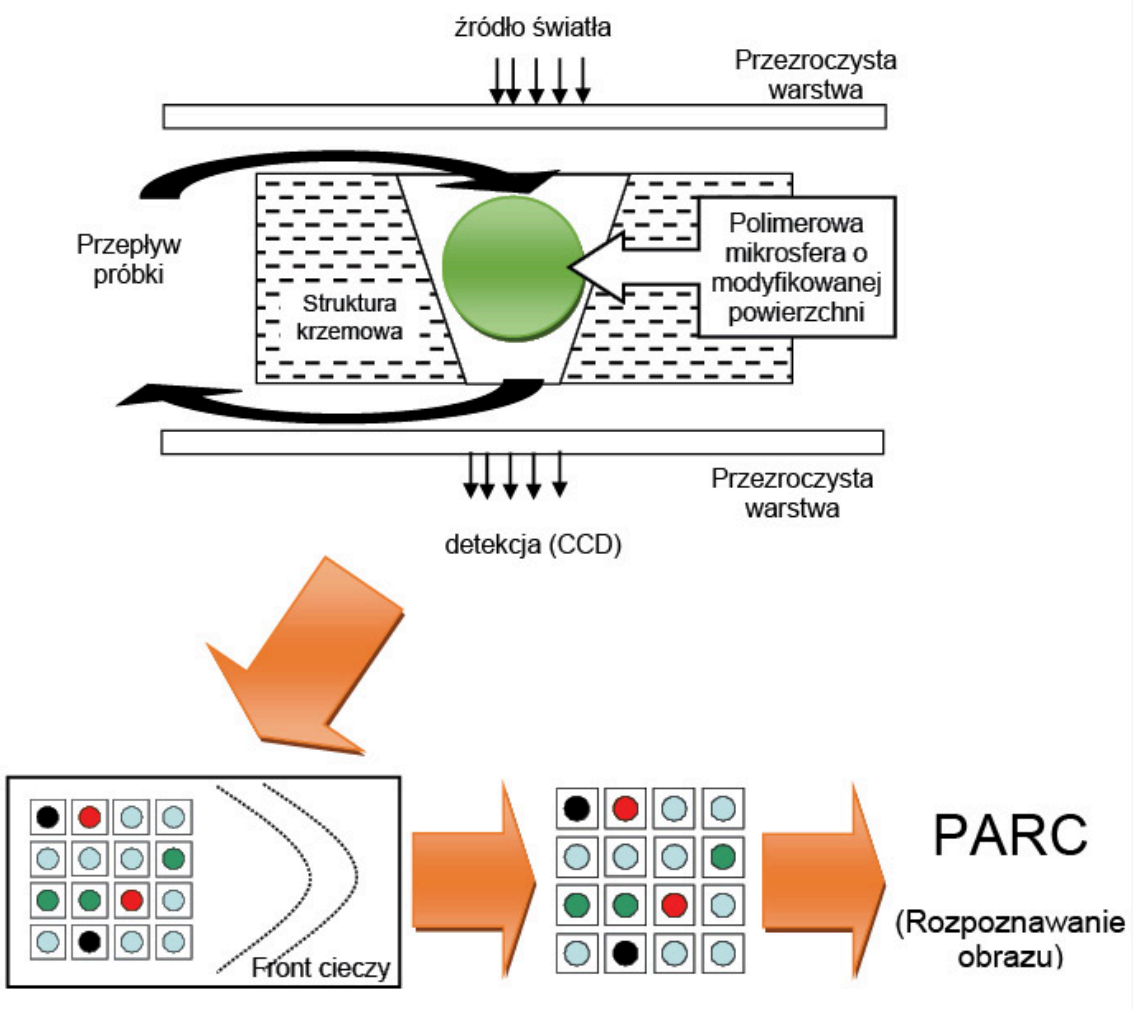
RYS. 7.5

Światłowodowy elektroniczny język

W przypadku klasycznych sensorów stosowanych w elektronicznym języku i nosie, dalsze badania skupiają się obecnie przede wszystkim na:

- ich miniaturyzacji,
- zmniejszeniu kosztów ich wytwarzania,
- zwiększeniu szybkości odpowiedzi systemów,
- zwiększeniu stabilności odpowiedzi,
- zmniejszeniu dryftu sygnału sensorów, wchodzących w skład matryc,

- poszukiwaniu nowych materiałów receptorowych (membrany komórkowe, białka receptorowe, całe komórki sensoryczne).



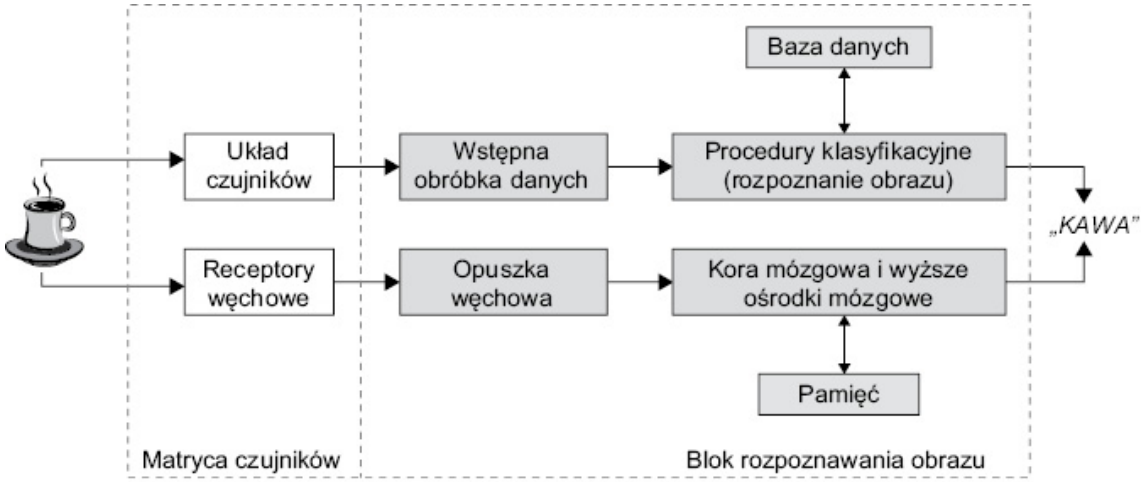
RYS. 7.6

Optyczny elektroniczny język wykorzystujący mikrosfery pułapkowane w strukturach krzemowych

7.2
Metody rozpoznawania obrazu

Matryca czujnikowa elektronicznego nosa i języka dostarcza szeregu sygnałów – jest to związane z wkładem każdego z czujników w matrycy oraz z często stosowanym zbieraniem sygnału dynamicznego (krzywa odpowiedzi sensora w funkcji czasu). Powstające wielowymiarowe dane muszą więc zostać odpowiednio przetworzone w celu ekstrakcji informacji istotnej analitycznie. Podobnie jak w przypadku naturalnych odpowiedników, analiza sygnałów sensorycznych polega najpierw na przetwarzaniu wstępnym (*preprocessing*), a następnie na zastosowaniu odpowiedniej procedury klasyfikacyjnej, mającej za zadanie przypisanie próbki do odpowiedniego rodzaju/klasy próbek, lub określenie jej specyficznych właściwości (rys. 7.7). Próbka jest klasyfikowana dzięki porównaniu jej wzoru odpowiedzi ze zbiorem wzorców znanych z przeszłości. Ten zbiór wzorców znajduje się w przypadku człowieka w jego pamięci, a w przypadku elektronicznego nosa i języka – w bazie danych zebranych podczas pomiarów kalibracyjnych. Zespół różnorodnych procedur numerycznych służących przetwarzaniu wstępnemu i rozpoznawaniu „profilu" próbki badanej to tzw. **blok rozpoznawania obrazu** (*pattern recognition system*, PARC) elektronicznego nosa/języka. Tworzą go różnorodne metody matematyczne, statystyczne, uczenia maszynowego, przetwarzania sygnałów. Celem PARC jest najczęściej klasyfikacja próbki, czyli przyporządkowanie **obiektu** do większych zespołów – **klas** (np. miejsce pochodzenia produktu, rozpoznanie

rodzaju napoju), bądź ilościowe określenie wartości cechy obiektu (np. zawartość tłuszczu w mleku).

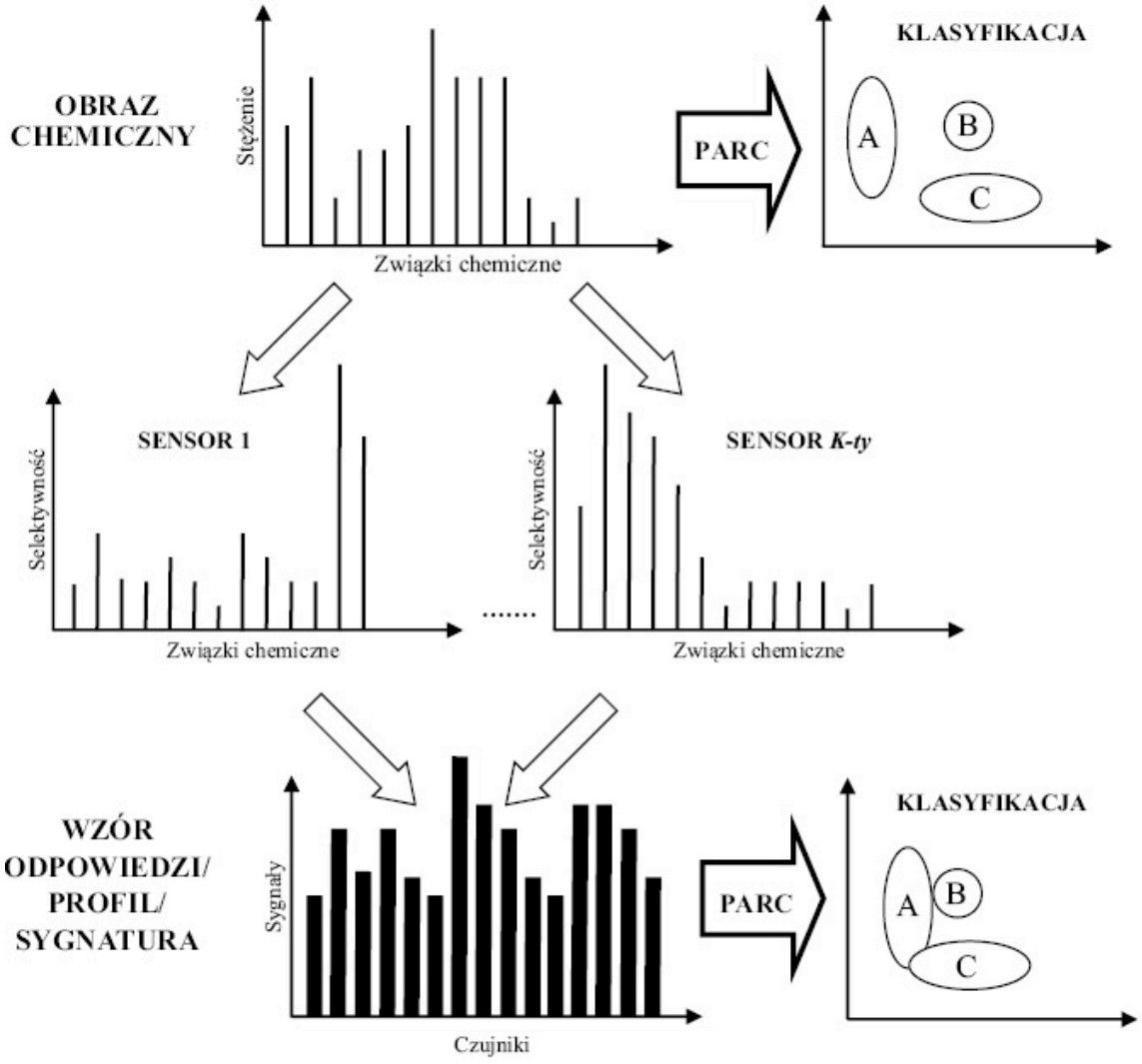


RYS. 7.7

Schemat działania elektronicznego nosa i jego naturalnego odpowiednika [1]

Klasyfikacja obiektów może być dokonywana za pomocą metod **nadzorowanych** lub **nienadzorowanych**. W pierwszym przypadku podział na klasy jest znany *a priori*, jest zdefiniowany przez badacza, natomiast w drugim podział na klasy jest dokonywany na podstawie statystycznego podobieństwa cech obiektów. Klasyfikacja nie odbywa się poprzez porównywanie wartości kolejnych cech/sygnałów sensorów, ale poprzez całościową ocenę „profilu" obiektu – tak samo dzieje się w przypadku naturalnego rozpoznawania smaku i zapachu, w którym wiele receptorów jest pobudzanych w różnym stopniu. W ten sposób powstaje charakterystyczny wzór pobudzeń receptorów („profil"/"sygnatura"), który jest indywidualny dla każdej próbki. Poprzez porównanie tego wzoru pobudzeń kubków smakowych ze wzorami zapamiętanymi w przeszłości, następuje przyporządkowanie

pożywienia/zapachu do określonego rodzaju. „Wzór odpowiedzi”/”profil”/”sygnatura” próbki to zatem unikalny, charakterystyczny dla danej próbki „odcisk palca” w wielowymiarowej przestrzeni danych (rys. 7.8).



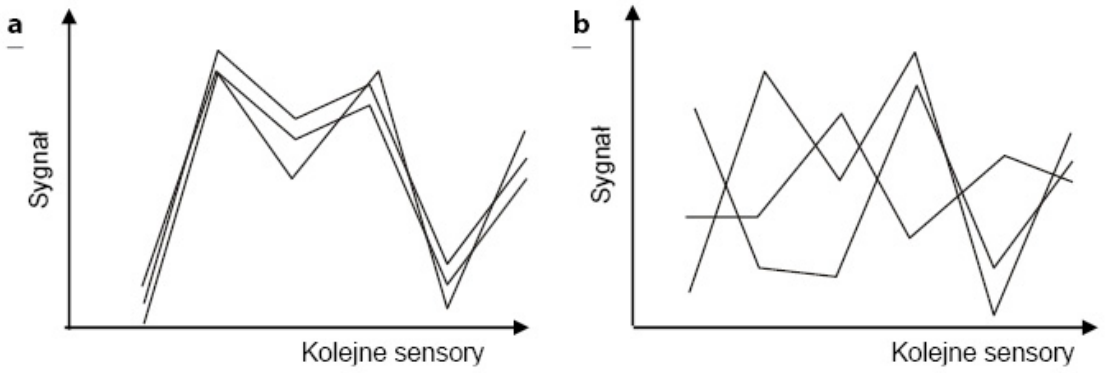
RYS. 7.8

Porównanie obrazu chemicznego próbki z wzorem odpowiedzi/profilem/sygnaturą próbki [2]

Próbki o podobnym obrazie chemicznym charakteryzują się dużym podobieństwem, mają podobny skład lub właściwości, tak więc generują podobne profile odpowiedzi. Wzory odpowiedzi różnią się w przypadku próbek różnego rodzaju, a zatem i składu (co powoduje różnice w sygnałach czujników chemicznych). W sposób sformalizowany określa się **wzór odpowiedzi** (tzw. **wektor obrazu**) jako wektor ***n*** cech określających daną próbkę (najczęściej wartości sygnałów ***n*** kolejnych czujników):

$$x = (x_1, x_2, ..., x_n)$$

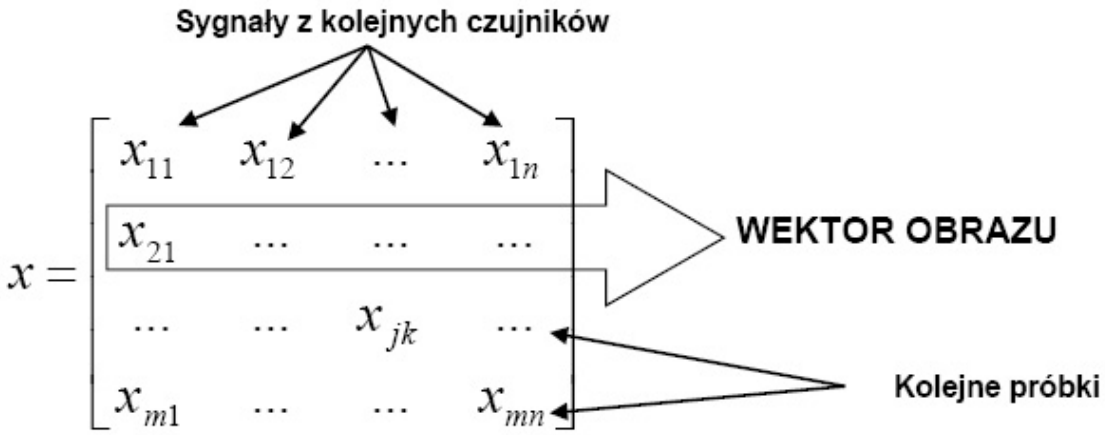
Wzór odpowiedzi oznacza także wizualną reprezentację odpowiedzi kolejnych czujników – charakterystyczna krzywa powstała po naniesieniu wartości sygnałów kolejnych sensorów jest jednoznaczna i charakterystyczna dla danej próbki (rys. 7.9).



RYS. 7.9

Wzory odpowiedzi w przypadku próbek o podobnym składzie chemicznym (a) i próbek o znacznie odmiennym składzie chemicznym (b) [2]

Wzory odpowiedzi uzyskane podczas pomiarów wielu próbek tworzą **macierz danych *X***. Dane w kolumnach to sygnały kolejnych czujników, a każdy wiersz oznacza kolejną próbkę (Rys. 7.10).



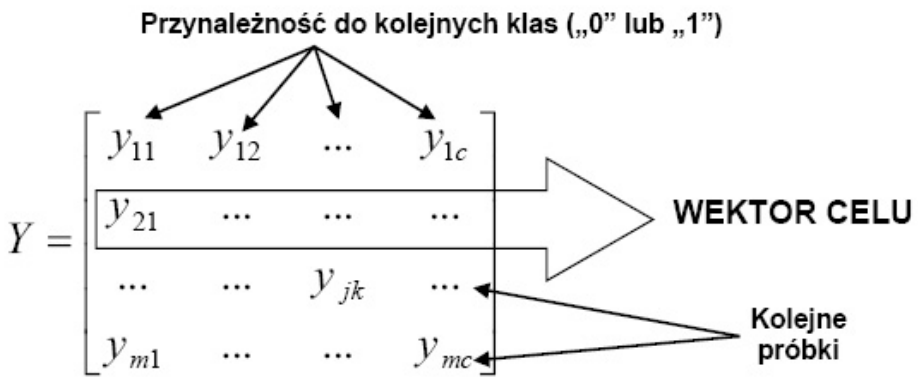
RYS. 7.10

Macierz danych i wektor obrazu [2]

Do klasyfikacji nadzorowanej jest jeszcze konieczne zdefiniowanie klas, a zatem określenie dla każdej próbki **wektora celu**, czyli zakodowanej w postaci numerycznej przynależności do określonej klasy obiektów. W przypadku ***c*** klas przynależność jest najczęściej zakodowana w postaci *c*-wymiarowego wektora:

$$y = (y_1, y_2, \ldots, y_j \ldots, y_c) = \begin{cases} y_j = 1 & \text{jeśli obiekt należy do } j\text{-tej klasy} \\ y_j = 0 & \text{jeśli obiekt nie należy do } j\text{-tej klasy} \end{cases}$$

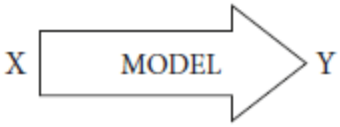
Przykładowo, wektor celu [0 0 1 0 0 0] oznacza, że próbka należy do trzeciej spośród sześciu klas. Natomiast uporządkowane w odpowiedniej kolejności wektory celu tworzą **macierz celu *Y*** (Rys. 7.11).



RYS. 7.11

Macierz celu i wektor celu w analizie klasyfikacyjnej [2]

Zadaniem bloku rozpoznawania obrazu jest więc znalezienie **modelu – klasyfikatora**, który pozwala na wyznaczenie relacji:



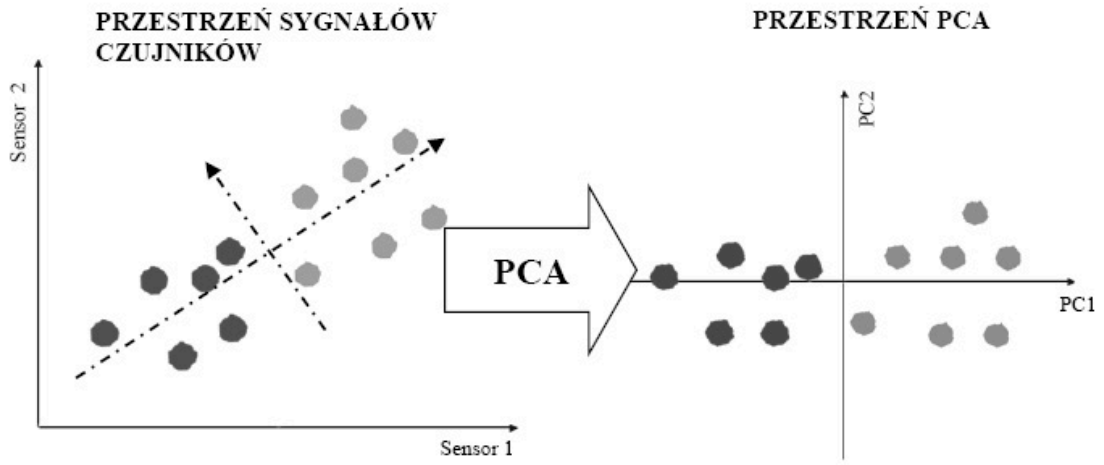
W praktyce jest to realizowane analogicznie do przetwarzania naturalnego, a więc rozpoznanie obrazu chemicznego próbki odbywa się dwustopniowo. Pierwszym etapem jest przetwarzanie wstępne, po czym następuje właściwa klasyfikacja poprzez porównanie wzoru odpowiedzi ze wzorami znajdującymi się w bazie danych.

Macierz danych jest **wstępnie przetwarzana** (*preprocessing*), w celu umożliwienia/ułatwienia dalszej analizy. Polega to najczęściej na liniowej transformacji danych bez zmiany liczby wymiarów problemu. Dzięki temu wyniki stają się niezależne od stosowanych jednostek, a wszystkie dane są równomiernie rozmieszczone w przestrzeni danych. Dane znajdujące się w macierzy danych są obarczone szumem oraz informacją nadmiarową, skorelowaną z sygnałami innych czujników. Dzięki wstępnemu przetwarzaniu,

informacja użyteczna jest separowana od tła, szum zostaje usunięty oraz następuje wzmocnienie stosunku sygnał–szum. Sygnały pochodzące z czujników chemicznych tego samego typu są bardzo często częściowo ze sobą skorelowane – techniki wstępnego przetwarzania umożliwiają znalezienie tej części informacji oraz jej usunięcie. Można też wydobywać znaczące dla klasyfikacji cechy obrazu, podczas gdy nieistotne z punktu widzenia klasyfikatora cechy zostają pominięte (*feature extraction*). Dodatkową zaletą wstępnego przetwarzania jest możliwość zmniejszenia składowych wektora obrazu ostatecznie wykorzystywanych przez klasyfikator, co korzystnie wpływa na rzetelność przetwarzania za jego pomocą danych.

Najczęściej stosowaną techniką preprocessingu w przypadku elektronicznych języków i nosów jest **Analiza Głównych Składowych** (*principal components analysis*, **PCA**), technika eksploracji danych umożliwiająca wnioskowanie o obiektach opisanych wieloma zmiennymi. Podstawą PCA jest analiza rozkładu zmienności danych pochodzących z wielu pomiarów, a następnie znalezienie nowych, ortogonalnych względem siebie kierunków w wielowymiarowej przestrzeni danych, które w maksymalny sposób pozwolą na ukazanie tej zmienności. **PCA** umożliwia uporządkowanie informacji tak, że w pierwszych wymiarach znajduje się największa ilość informacji znaczącej (rys. 7.12), dzięki temu możliwe jest przedstawienie danych w postaci wyników PCA, we współrzędnych zwanych Głównymi Składowymi (liniowe kombinacje danych pierwotnych). Na wykresie dwu- lub trzywymiarowym możliwa jest w ten sposób wizualizacja podobieństwa badanych obiektów. Powstają skupienia (**klastry**) obiektów o podobnych

właściwościach. Im większe odległości na wykresie wyników PCA, tym mniejsze podobieństwo między obiektami. Przykładowa klasyfikacja próbek 3 klas: *A*, *B* i *C*, dokonana za pomocą PCA jest pokazana na rys. 7.13.

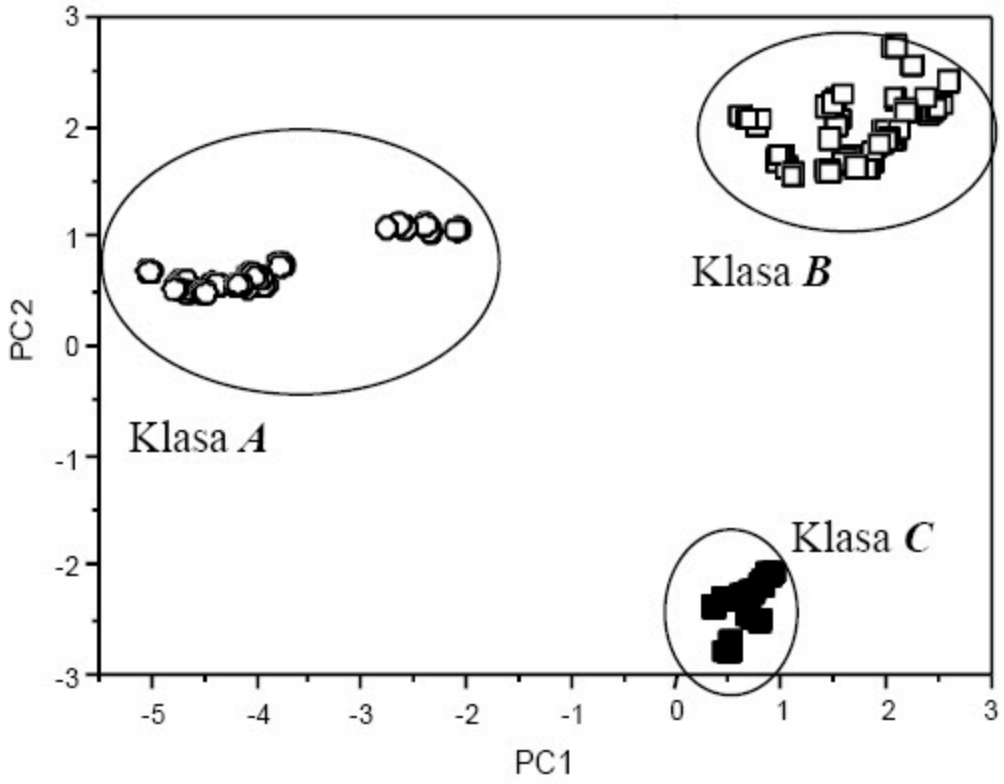


RYS. 7.12

Idea przetwarzania danych za pomocą Analizy Głównych Składowych [2]

Podobieństwo obiektów może być weryfikowane za pomocą PCA, jednak przyporządkowanie nieznanego wektora nie może odbyć się jedynie na zasadzie naniesienia go na wykres PCA i wizualnego przyporządkowania go do określonej klasy. Konieczne jest wyznaczenie **granic** pomiędzy poszczególnymi klasami próbek. Jest to zadaniem **klasyfikatora**, którego działanie wymaga przeprowadzenia procesu uczenia na przykładach, czyli dopasowania modelu tak, aby przy określonych wektorach obrazu na wyjściu klasyfikatora pojawiał się wektor wyjściowy możliwie najbardziej zbliżony do odpowiedniego wektora celu. Jest to **faza uczenia** klasyfikatora, natomiast dane przetwarzane w tej fazie to **zestaw uczący**. Dopasowanie klasyfikatora do modelowania relacji **X** → **Y**

opisuje **funkcja błędu**, którą najczęściej jest średni błąd kwadratowy – **MSE** (*Mean Squared Error*). Gdy jego wielkość jest odpowiednio niska, co jest związane także z satysfakcjonującą ilością prawidłowych klasyfikacji próbek zbioru uczącego, następuje **walidacja klasyfikatora** za pomocą **zbioru testowego**. W jego skład wchodzą obiekty podobne, ale nie identyczne do tych ze zbioru uczącego (obiekty inne niż użyte do stworzenia modelu). Dzięki temu są sprawdzane możliwości generalizacyjne systemu (**faza testowania**). Jeśli walidacja przebiegnie pomyślnie, klasyfikator jest gotowy do rozpoznawania nieznanych próbek (**faza pracy**).

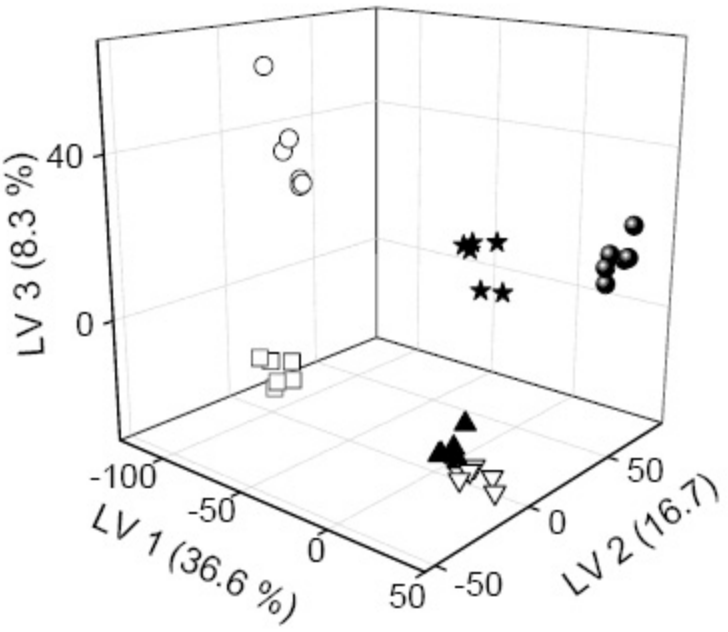


RYS. 7.13

Przykładowy wykres PCA [2]

W bloku rozpoznawania obrazu elektronicznego języka i nosa najczęściej w roli klasyfikatora są stosowane różnego rodzaju **sztuczne sieci neuronowe** (*Artificial Neural Network*, ANN) oraz metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów **PLS-DA** (*Partial Least Squares – Discriminant Analysis*).

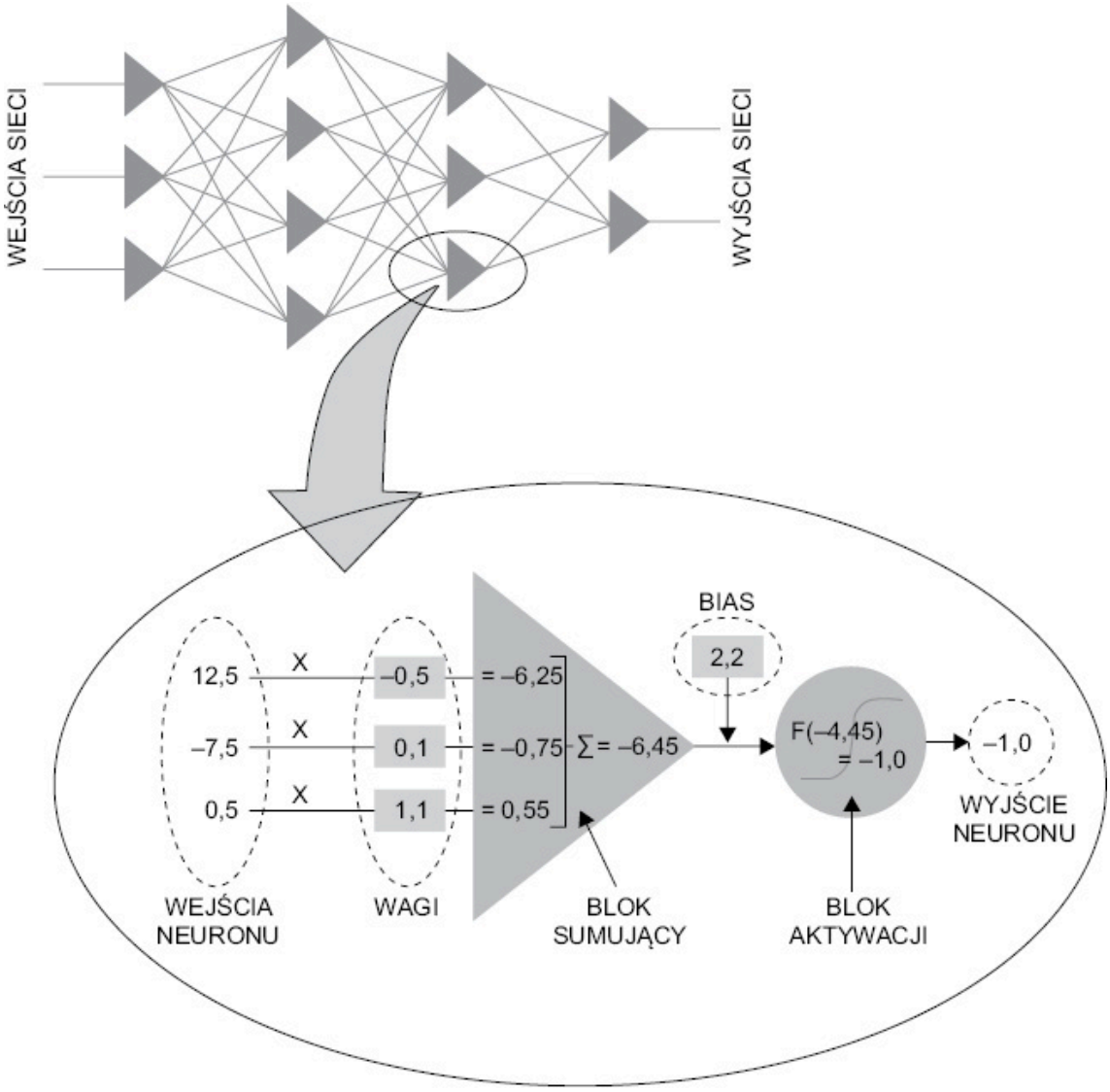
Metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów **PLS** jest metodą modelowania bardzo często stosowaną w chemometrii, zwłaszcza wtedy, kiedy bardzo wiele zmiennych opisuje każdy obiekt, a tak jest w przypadku układów wielosensorowych. PLS służy do znalezienia relacji między dwiema macierzami – macierzą danych X i macierzą celu Y, opisując ją za pomocą tzw. zmiennych ukrytych (ang. *latent variables*), objaśniających w możliwie maksymalny sposób kowariancję pomiędzy tymi zbiorami danych. W wariancie dyskryminacyjnym PLS, czyli w metodzie PLS-DA, macierz celu zawiera dane jakościowe (zakodowane przynależności klasowe), a sam sposób działania algorytmu jest taki sam. Zmienne ukryte są odpowiednikami składników głównych w PCA. Analogicznie też jak w PCA, możliwe jest otrzymanie wykresu wyników PLS, najczęściej przedstawianego w postaci dwuwymiarowej we współrzędnych pierwsza zmienna ukryta – druga zmienna ukryta. Widoczne na nim są skupiska obiektów zgrupowanych w klastry odpowiadające klasom zakodowanym w macierzy celu. Na przykładowym trójwymiarowym wykresie PLS-DA (rys. 7.14) w przestrzeni LV1-LV2-LV3 jest widoczne idealne rozróżnienie większości klas – jedynie klastry klas oznaczonych trójkątami nakładają się na siebie, czyli są w mniejszym stopniu rozróżnialne za pomocą tej metody.



RYS. 7.14
Przykładowy wykres PLS-DA

Sieci neuronowe to model matematyczny, charakteryzujący się nieliniowym przetwarzaniem sygnałów, a więc bliższym biologicznemu odpowiednikowi elektronicznego języka i nosa. W przybliżeniu imitują one połączenia komórek nerwowych w mózgu i charakteryzują się dużą zdolnością do generalizowania zdobytej wiedzy, adaptacji do niepełnych bądź częściowo wadliwych danych i możliwością modelowania skomplikowanych relacji wejście–wyjście. Istnieje wiele rodzajów sieci neuronowych, które są stosowane w przetwarzaniu sygnałów matryc sensorowych, ale najpopularniejsze są dwu- lub trzywarstwowe sieci neuronowe ze wsteczną propagacją błędu. Warstwy sieci składają się z tzw. **neuronów** (rys. 7.15). Są to elementy sumujące o kilku wejściach i jednym wyjściu. Sygnał na wejściu jest poddawany wzmocnieniu

proporcjonalnemu do wielkości wagi. Po przemnożeniu sygnałów przez odpowiednie wagi i zsumowaniu ich, otrzymana wartość może dodatkowo zostać zmodyfikowana o stałą wielkość (*bias*). Otrzymany wynik jest argumentem funkcji aktywacji – jej wartość pojawia się na wyjściu neuronu. W najczęściej stosowanych sieciach neuronowych neurony są połączone w warstwy tak, że wyjścia neuronów jednej warstwy stanowią wejścia dla neuronów następnej. Wynik otrzymany na pojedynczym wyjściu każdego neuronu jest przekazywany do każdego neuronu w warstwie kolejnej (np. wartość „-1” zostanie przekazana do obydwu neuronów ostatniej warstwy sieci z rys. 7.15).



RYS. 7.15

Schemat sztucznej sieci neuronowej i neuronu. Na wejścia sieci jest podawany wektor obrazu, na wyjściach pojawia się wektor wyjściowy [1]

Sieci neuronowe, jak każdy klasyfikator, wymagają przeprowadzenia procesu uczenia. Jest to z reguły proces iteracyjny, polegający na minimalizacji liczby błędnych klasyfikacji obiektów zbioru uczącego. Dzieje się tak dzięki modyfikowaniu wag połączeń neuronów, zgodnie z algorytmem działania sieci, przy czym postęp uczenia jest monitorowany poprzez zmiany wielkości funkcji błędu

(MSE). Po zminimalizowaniu funkcji błędu następuje faza walidacji, a następnie sieć neuronowa działa jako gotowy klasyfikator, tj. automatyczna procedura numeryczna, mająca za zadanie przyporządkowanie danego obrazu chemicznego do danej klasy.

W bloku rozpoznawania obrazu elektronicznego języka i nosa oprócz sieci neuronowych ze wsteczną propagacją błędu oraz PLS-DA są także stosowane inne procedury numeryczne, np. SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*), KNN (*K-Nearest Neighbours*), LDA (*Linear Discriminant Analysis*) itd. Wciąż są opracowywane nowe metody oraz modyfikacje już istniejących, ponieważ nie istnieje jedna, uniwersalna procedura analizy danych pochodzących z matryc czujnikowych. Idealny klasyfikator powinien wykazywać niską liczbę błędów zarówno dla zbioru uczącego, jak i testującego (dzięki dużej zdolności do generalizowania zdobytej wiedzy), czyli charakteryzować się odpowiednią dokładnością. Bardzo ważne są również inne parametry charakteryzujące jakość działania tych modeli, takie jak czułość, specyficzność oraz precyzja. Dodatkowo, dobry klasyfikator powinien być stosunkowo elastyczny, żeby prawidłowo modelować lokalne zmiany w strukturze danych, a jego uczenie powinno być wystarczająco szybkie.

7.3
Rozwiązania komercyjne i zastosowania

Wyniki badań prowadzonych do dziś doprowadziły do opracowania elektronicznych nosów i języków jako urządzeń dostosowanych do konkretnych aplikacji. Dzięki skróceniu czasu analizy chemicznej jest możliwa automatyczna kontrola jakości (w tym „smaku") w przemyśle spożywczym, np. podczas procesów dojrzewania sera, czy monitorowanie zanieczyszczeń rzek, wody gruntowej, powietrza. Chemiczne sztuczne zmysły mogą również służyć do wykrywania broni biologicznej i chemicznej, narkotyków, materiałów wybuchowych. Są alternatywną metodą oznaczania czystości produktów przemysłu chemicznego. Niezwykle obiecującą wydaje się także perspektywa zastosowania tych urządzeń w diagnostyce medycznej do analizy wydechu pacjenta, moczu, potu, zapachu skóry, co pozwoliłoby na nieinwazyjne wykrywanie zakażeń bakteryjnych czy chorób metabolicznych. Ten szeroki potencjał aplikacyjny został przedstawiony w tabeli 7.1.

TABELA 7.1

Zastosowania elektronicznych nosów i języków [1]

Obszar zastosowań	Przykładowe zastosowania
Przemysł spożywczy	• Kontrola jakości podczas przechowywania i produkcji (np. wody mineralne, wino, kawa, mleko, soki) • Optymalizacja bioreaktorów • Kontrola procesów starzeniowych sera, whisky • Automatyczna kontrola smaku
Medycyna	• Nieinwazyjna diagnostyka (wydech pacjenta, analiza moczu, potu, zapachu skóry) • Kliniczne monitorowanie *in vivo* • Określanie maskowania smaku gorzkiego w farmaceutykach
Bezpieczeństwo	• Detekcja broni biologicznej i chemicznej • Wykrywanie narkotyków, materiałów wybuchowych • Identyfikacja „wróg-czy-przyjaciel” (dotychczasowe metody opierają się na analizie wzoru tęczówki oka, odcisku palca)
Monitorowanie zanieczyszczeń środowiska	• Monitorowanie rolniczych i przemysłowych zanieczyszczeń powietrza, wód powierzchniowych i gruntowych • Identyfikacja toksycznych substancji • Wykrywanie wycieków niebezpiecznych substancji
Kontrola jakości powietrza w zamkniętych pomieszczeniach	• Pomieszczenia biurowe, przemysłowe, handlowe – kontrola systemów wentylacyjnych • Stacje kosmiczne
Przemysł chemiczny	• Czystość produktu • Detekcja grup funkcyjnych • Rozróżnienie chiralne
Prawna ochrona wynalazku	• Cyfrowy „odcisk palca” smaku i zapachu – standaryzacja właściwości smakowych/zapachowych w celu ochrony patentowej

Szerokie zapotrzebowanie i różnorakie możliwości aplikacyjne elektronicznych nosów i języków spowodowały pojawienie się w ostatnim dwudziestoleciu wielu komercyjnych systemów tego typu (tabela 7.2). Ich cena kształtuje się na poziomie od kilku do kilkudziesięciu tysięcy dolarów. Liczba komercyjnie dostępnych sztucznych nosów znacząco jednak przewyższa liczbę dostępnych elektronicznych języków.

Dążenie do miniaturyzacji urządzeń i systemów analitycznych sprawiło, że również elektroniczne nosy i elektroniczne języki są konstruowane zgodnie z tą tendencją. Poza urządzeniami o stosunkowo dużych wymiarach (np. NST 3320) coraz częściej na rynku są dostępne systemy przenośne (VOCmeter) oraz systemy o wielkości i konstrukcji palmtopa (VOCcheck, Cyranose320). Proponowane są także urządzenia sterowane zdalnie, a także takie, w których akwizycja sygnałów optycznych oraz blok rozpoznawania obrazu są realizowane za pomocą smartfona.

TABELA 7.2

Systemy komercyjne

	Firma	Model	Matryca		Rozpoznawanie obrazu
			Liczba czujników	Typ czujników	
NOS	Airsense Analytics	i-PEN, PEN2, PEN-3	6–10	MOS	PCA, ANN, KNN
	Applied Sensor	NST 3320, VOC meter, VOC check	4–12	MOS, QMB	PCA, ANN
	Alpha MOS	FOX, Prometheus, Heracles	6, 12, 18, 24	CP, MOS, QMB	PCA, ANN
	Scensive Technologies	Bloodhound ST 214	14	CP	PCA, ANN
	Intelligent Optical Systems, Inc.	Cyranose 320	32	CP	KNN, SIMCA
	Lennartz Electronic GMbH	MOSES II	16–40	MOS, QMB	PCA, ANN
	Sysca AG	Artinose	38	MOS	PCA
	Osmetech Plc (Aroma Scan)	AromaScan A32S	32	CP	ANN
JĘZYK	Anritsu Corp./INSENT Intelligent Sensor Technology, Inc.	Taste Sensing System TS-5000Z	8	ISE	PCA
	Alpha MOS	ASTREE	7	ISFET	PCA

Podsumowując, zapotrzebowanie na urządzenia wspomagające wadliwą pracę ludzkich organów bądź też na systemy naśladujące ludzkie zmysły spowodowało szeroki rozwój dziedziny sztucznych, bionicznych zmysłów. Urządzenia typu elektroniczny nos i elektroniczny język dzięki zainspirowanej neurofizjologią zasadzie działania stanowią nowy kierunek rozwoju analityki chemicznej. Przeznaczane są najczęściej do szybkiej, zautomatyzowanej analizy jakościowej – rozpoznawania i klasyfikacji wybranych grup produktów. Należy jednak pamiętać, że sztuczne narządy zmysłów

wciąż dalekie są od ich naturalnych odpowiedników. Główną różnicą jest przede wszystkim ilość stosowanych czujników/receptorów i wielkość bazy danych w porównaniu z ludzką pamięcią (tabela 7.3). Ponadto, występowanie dryftu sygnału sprawia, że matryce sensorowe wymagają stosunkowo częstej rekalibracji, która jest procesem bardziej skomplikowanym i czasochłonnym niż przy użyciu pojedynczych czujników. Jednak w przeciwieństwie do ludzkich zmysłów, których wadą jest subiektywność, uleganie adaptacji i zmęczeniu, a także wpływ stanu emocjonalnego i infekcji, sztuczne zmysły nie wykazują takich cech. Dodatkową zaletą jest również możliwość badania szerszego spektrum próbek (w tym toksycznych, niejadalnych, itp.).

TABELA 7.3

Porównanie zmysłów naturalnych i systemów je naśladujących [2]

	ZMYSŁY NATURALNE	**ZMYSŁY SZTUCZNE**
TWORZENIE WZORU ODPOWIEDZI	RECEPTORY: • nieselektywne • ogromny nadmiar (10^8) • przetwarzanie biochemiczne • sygnał: wzór „pików”	SENSORY: • nieselektywne/selektywne • niska redundancja (10) • przetwarzanie chemiczne • sygnał: ustalony
DOSTARCZANIE PRÓBKI	Periodyczne (np. oddech)	Ciągłe
PRZETWORZENIE SYGNAŁU	Synteza danych	1 sensor – 1 sygnał
ANALIZA DANYCH	• ogromna baza danych • kompensacja dryftu • wysoka integracja z innymi narządami zmysłów	• ograniczona baza danych • słaba kompensacja dryftu • możliwość integracji z innymi instrumentami (np. połączenie sztucznego nosa i języka)

Obecnie jest prowadzonych wiele badań mających na celu dalszy rozwój elektronicznych nosów i języków. Powstają hybrydowe elektroniczne języki i nosy, w których w jednym urządzeniu zintegrowane są czujniki do analizy próbek ciekłych i czujniki gazowe, co pozwala uzyskiwać lepsze zdolności klasyfikacyjne. Dodatkowo, w ten sposób jest możliwa symulacja wspólnego działania dwóch zmysłów – smaku i zapachu. Łączenie kilu metod pozwala na lepsze scharakteryzowanie próbki, ponieważ są brane pod uwagę różne jej właściwości. Obraz chemiczny tej próbki staje się wtedy pełniejszy, całościowo uwzględnia jej szereg właściwości fizykochemicznych. Bliższa symulacja powstawania bodźców związanych z rozpoznawaniem pożywienia wymaga jednak dalszego łączenia różnego typu sensorów, nie tylko chemicznych. Zgodnie z równaniem:

Odczuwany smak = zapach + smak + tekstura + kolor + dźwięk + temperatura

kolejne etapy symulowania zmysłów chemicznych powinny obejmować badania nad całościową charakterystyką próbki, a więc konieczne będzie uwzględnienie sensorów fizycznych: ciśnienia/dotyku, czujników akustycznych, temperatury i in. Ostatnie badania nad budową sztucznego języka i nosa koncentrują się nie tylko na opracowywaniu nowych metod pomiarowych i zastosowaniu różnorakich procedur numerycznych, lecz także na poszukiwaniu nowych materiałów chemoczułych dostosowanych do aplikacji multisensorowych. Bardzo obiecującym nowym trendem jest zastosowanie materiału biologicznego w elektronicznych nosach

i językach – receptorów i ich fragmentów peptydowych lub całych komórek sensorycznych zamiast typowych czujników chemicznych.

Podziękowania

Niniejsza praca była współfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki, Polska, w ramach grantu SONATA BIS Nr UMO-2018/30/E/ST4/00481.

Literatura

1. Ciosek P., Wróblewski W., „Elektroniczny nos i elektroniczny język – systemy do automatycznego rozpoznawania próbek złożonych" w: *Nowoczesne techniki analityczne*, red. M. Jarosz, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2006, s. 351–368.
2. Ciosek P., „Zastosowanie koncepcji elektronicznego nosa i języka do klasyfikacji próbek spożywczych i fizjologicznych" w: *Mikrobioanalityka*, red. Z. Brzózka, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2009, s. 184–217.
3. Mazerski J., *Chemometria praktyczna*, Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2016.
4. Miller J., Miller J., *Statystyka i chemometria w chemii analitycznej*, PWN, Warszawa 2019.
5. Ciosek P., Wróblewski W., „Sensor arrays for liquid sensing – electronic tongue systems", *Analyst*, 2007, **132**, 963–978.

Elektroniczny nos:

6. Boeker P., „On 'Electronic Nose' methodology", *Sens. Actuators B*, 2014, **204**, 2–17.
7. Marti M.P., Boque R., Busto O., Guasch J., „Electronic noses in the quality control of alcoholic beverages", *Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 57–66.

8. Arshak K., Moore E., Lyons G.M., Harris J., Clifford S., „A review of gas sensors employed in electronic nose applications”, *Sens. Rev.*, 2004, **24**, 181–198.

9. Casalinuovo I.A., Di Pierro D., Coletta M., Di Francesco P., „Application of electronic noses for disease diagnosis and food spoilage detection”, *Sensors*, 2006, 6, 1428–1439.

10. Loutfi A., Coradeschi S., Mani G.K., Prabakaran S., Rayappan J.B.B., „Electronic noses for food quality: A review”, *J. Food Eng.*, 2015, **144**, 103–111.

11. Askim J.R., Mahmoudia M., Suslick K.S., „Optical sensor arrays for chemical sensing: the optoelectronic nose”, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 8649–8682.

12. Li Z., Askim J.R., Suslick K.S., „The Optoelectronic Nose: Colorimetric and Fluorometric Sensor Arrays”, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 231–292.

Elektroniczny język:

13. Escuder-Gilaberta L., Peris M., „Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis”, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **665**, 15–25.

14. Jiang H., Zhang M., Bhandari B., Adhikari B., „Application of electronic tongue for fresh foods quality evaluation: A review”, *Food Rev. Int.*, 2018, **34**, 746–769.

15. Legin A., Rudnitskaya A., Vlasov Y., „Electronic Tongues: Sensors, Systems, Applications” w: *Sensors Update vol. 10*, red. Baltes H., Fedder G.K., Korvink J.G., Wiley-VCH, Weinheim 2002, s. 143–188.

16. Winquist F., Krantz-Rulcker C., Lundstrom I., „Electronic tongues and combinations of artificial senses” w: *Sensors Update vol. 11*, red. H. Baltes, G.K. Fedder, Korvink J.G., Wiley-VCH, Weinheim 2002, s. 279–306.

17. Zang C., Bailey D.P., Suslick K.S., „Colorimetric sensor arrays for the analysis of beers: a feasibility study”, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 4925–4931.

8

Sensory chemiczne jako detektory w przepływowych układach (bio)analitycznych

Michał CHUDY, Ewa KOBYLSKA

Sensory chemiczne, a w szczególności biosensory, odgrywają coraz większą rolę w nowoczesnej analityce chemicznej. Gwałtowny rozwój dziedziny, jaki obserwujemy w ostatnich dziesięcioleciach, prowadzi ku opracowywaniu systemów pomiarowych charakteryzujących się wysoką przepustowością oraz umożliwiających szybkie uzyskiwanie wyników analiz. Stale rosnące wymagania środowiskowe i przemysłowe powodują, że na rynku są poszukiwane rozwiązania coraz dokładniejsze i czulsze, dzięki którym możliwe jest wykrywanie i oznaczanie analitów na coraz niższych

poziomach stężeń. Nowo opracowywane systemy pomiarowe stanowią więc przedmiot zainteresowania nie tylko pasjonatów nowinek technologicznych i czytelników fachowej literatury tematu. Niesłabnący trend minimalizacji i automatyzacji opracowywanych układów pomiarowych sprzyja bowiem wdrażaniu tego typu rozwiązań w szerokim zakresie działalności człowieka, od zastosowań w monitoringu przebiegu procesów wytwórczych w przemyśle po aplikacje związane z badaniem stanu środowiska i szeroko pojętą ochroną przyrody. Szczególną grupę czujników stanowią układy pomiarowe wykorzystujące warunki przepływowe, umożliwiające prowadzenie zautomatyzowanych analiz w trybach on-line czy in-line (np. w kontroli warunków procesów prowadzonych w fermentorach przemysłowych), jak również znajdujące szerokie zastosowanie wszędzie tam, gdzie potrzebne są praktycznie bezobsługowe systemy do analiz próbek o ograniczonej objętości (np. w prowadzeniu szybkiej diagnostyki medycznej w gabinetach lekarskich).

W niniejszym rozdziale zaprezentowano przegląd wybranych rozwiązań technologicznych, stosowanych w czujnikach chemicznych pracujących w warunkach przepływowych. Przedstawiono także pokrótce zastosowania tego typu urządzeń w przemyśle, ochronie środowiska oraz w dziedzinach związanych z ochroną zdrowia.

8.1
Najważniejsze konfiguracje

stosowane w analizie przepływowej

8.1.1 Wprowadzenie

Analiza przepływowa opiera się na koncepcji ciągłego lub dyskretnego wprowadzania próbki badanej do segmentowanego lub niesegmentowanego strumienia nośnika, w którym in-line przeprowadzane są dodatkowe operacje, takie jak oczyszczanie, zatężanie analitu, czy mieszanie z reagentami w celu uzyskania łatwiej oznaczalnego produktu reakcji [1].

Termin analizy przepływowej wprowadzony został w latach 50. XX wieku przez Skeggsa [2], który zaproponował pionierski system służący do badania zawartości mocznika we krwi, składający się z kilku modułów, umożliwiających wykonywanie różnych operacji fizykochemicznych w sposób zmechanizowany. Gwałtowny wzrost zainteresowania tego typu technikami pojawił się już w połowie ubiegłego wieku, kiedy diagnostyka zaczęła odgrywać coraz większe znaczenie w medycynie. Rosnące zapotrzebowanie na testy laboratoryjne wymusiło rozwój dziedziny w kierunku coraz większej automatyzacji stosowanej aparatury oraz rozwoju technik o wysokiej przepustowości, przy jednoczesnym dążeniu do miniaturyzacji, minimalizacji ilości zużywanych odczynników oraz wytwarzanych odpadów, zwłaszcza tych toksycznych [3]. Od czasu zaproponowania pierwszych metod analitycznych wykorzystujących przepływ,

opracowano wiele rozwiązań technologicznych jego realizacji, które znalazły szerokie zastosowanie zarówno w praktyce laboratoryjnej, jak i w przemyśle. Główne usprawnienia dotyczyły zastosowania małych objętości próbek (rzędu 20–200 µl), wykorzystanie zminiaturyzowanych detektorów optycznych i elektrochemicznych, czy modułów do analizy rezonansu plazmonów powierzchniowych (SPR) [2].

8.1.2
Konstrukcja układów pomiarowych

Nowoczesne systemy stosowane do wstrzykowej analizy przepływowej składają się zwykle z podstawowych elementów, takich jak:

- wysokiej jakości element generujący przepływ, którym może być jedno- lub wielokanałowa pompa perystaltyczna, pompa strzykawkowa, wyposażona w silnik krokowy bądź mikropompa;
- zawór wstrzykowy do wprowadzania próbki badanej, często połączony z autosmaplerem;
- cela pomiarowa z detektorem, który rejestruje pożądane parametry fizyczne, przy czym najczęściej stosuje się detektory wykorzystujące zjawiska optyczne bądź elektrochemiczne;
- pętla reakcyjna lub komora mieszania, czyli elementu, w którym zachodzi mieszanie próbki z reagentami i przebiega reakcja.

Systemy analizy przepływowej charakteryzują się stosunkowo dużą elastycznością w projektowaniu pożądanych konfiguracji podzespołów. Poszczególne elementy są łatwo dostępne

i nieskomplikowane w montażu. Prostota konfiguracji sprawia, że w wielu systemach stosowane są dodatkowe, opcjonalne elementy, takie jak termostatowane moduły do ogrzewania próbki w celu przyspieszenia przebiegu reakcji chemicznej, moduły do ekstrakcji i zatężania próbek, filtry do usuwania cząstek stałych czy np. degazery, służące do usuwania ze strumienia pęcherzyków powietrza, stosowane w analizatorach z segmentacją strumienia.

8.1.3
Tryby pracy

W pomiarach wykonywanych z użyciem automatycznych analizatorów dyskretnych jednorazowe kuwety napełnione regentami (próbką badaną, wzorcami, odczynnikami, buforami) umieszcza się w statywie urządzenia. Analizator realizuje poszczególne etapu procedury analitycznej, pobierając za pomocą specjalnej igły odpowiednie reagenty z poszczególnych kuwet i dozując je do kuwety z próbką, która po przeprowadzeniu niezbędnych reakcji przemieszczana jest w urządzeniu do detektora. Pozwala to na pewne ograniczenie ilości zużywanych odczynników i generowanych odpadów w porównaniu z wykonywaniem analogicznej analizy przez chemika. W przeciwieństwie do tej metodologii, w analizie z użyciem ciągłego przepływu (*Continuous Flow Analysis*, CFA) próbkę wstrzykuje się do roztworu nośnika, płynącego z dużą szybkością przez przewód o małej średnicy. Po drodze próbka jest mieszana z odpowiednimi odczynnikami, a w wyniku zachodzącej reakcji powstaje produkt, którego

zawartość może być zmierzona, dając pośrednio informację o stężeniu analitu w próbce. Analizator przepływowy można sobie więc wyobrazić jako rodzaj „przenośnika taśmowego”, w którym odczynniki są dodawane do próbki wędrującej po „linii produkcyjnej”, skonstruowanej jako ciąg połączonych modułów do sekwencyjnego wykonywania zdefiniowanych w protokole analizy operacji. Dzięki wprowadzeniu ścisłej kontroli stosowanych warunków przepływu stało się możliwe uzyskanie dużej powtarzalności wykonywanych manipulacji. Przy zachowaniu stałości parametrów fizycznych procesu (szybkość przepływu, temperatura, ciśnienie w układzie), pomiary mogą być dokonywane po ściśle określonym czasie od połączenia reagentów, stosując tzw. sygnał chwilowy, zamiast sygnału równowagowego, z jakim mamy do czynienia dopiero po całkowitym przereagowaniu reagentów. Pozwoliło to na znaczne skrócenie czasu prowadzonych analiz i zwiększenie przepustowości metod.

Wyróżniono kilka podstawowych technik CFA w zależności od przyjętego sposobu realizacji przepływu. Do najczęściej stosowanych zalicza się:

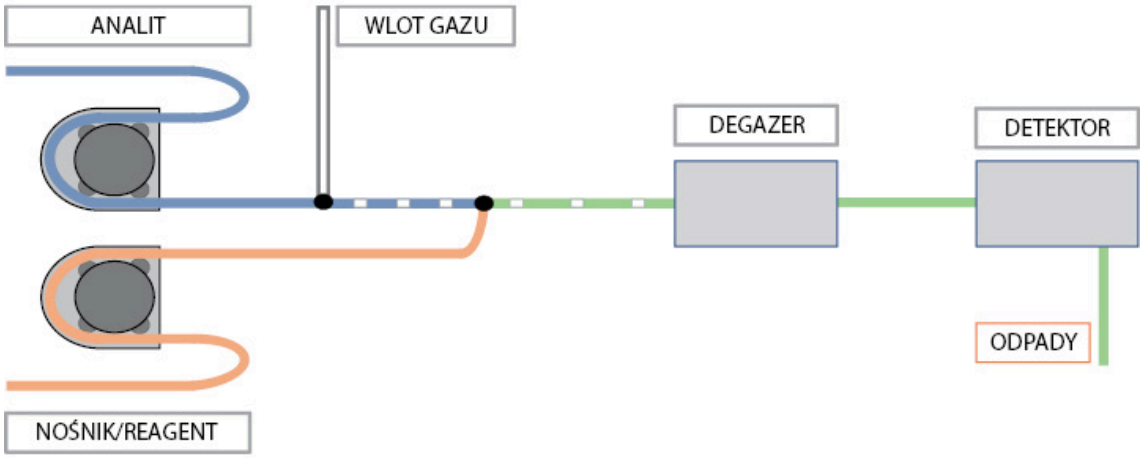
a) analizę z fragmentacją przepływu (*Segmented Flow Analysis,* SFA),

b) wstrzykową analizę przepływową (*Flow Injection Analysis*, FIA),

c) wstrzykową analizę sekwencyjną (*Sequential Injection Analysis*, SIA).

Technika analiz z fragmentacją przepływu (SFA) wykorzystuje segmentację strumienia płynu poruszającego się w przewodzie, realizowaną poprzez wprowadzenie pęcherzyków gazu (powietrza

lub azotu) pomiędzy porcje analizowanych próbek (rys. 8.1). Takie podejście ma na celu ograniczenie dyspersji wprowadzonego do układu analitu w nośniku.



RYS. 8.1

Schemat systemu do prowadzenia analiz z segmentacją przepływu; opracowanie własne na podstawie [3]

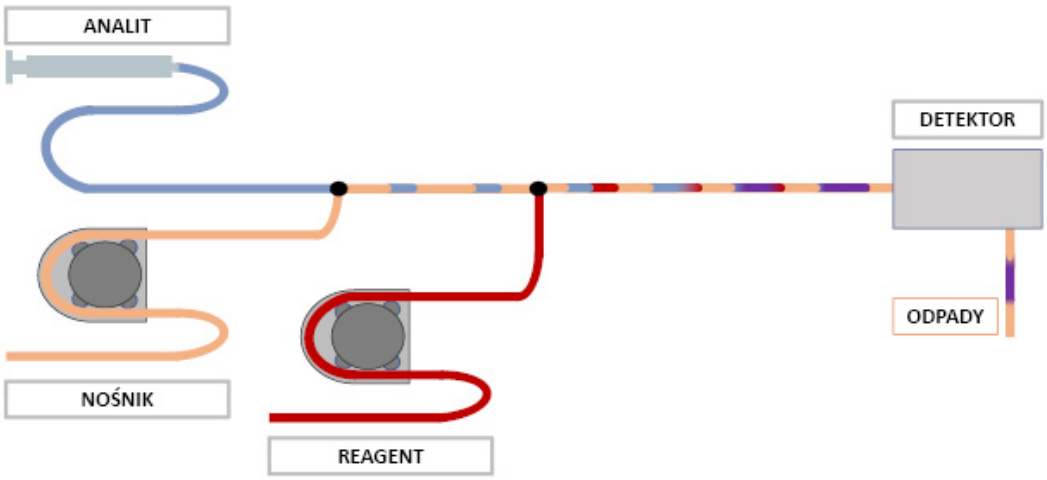
Jeżeli procedura analityczna przewiduje przeprowadzenie reakcji, która w standardowych warunkach przebiega powoli, zastosowanie segmentacji pozwala na chwilowe zatrzymanie przepływu lub ogrzanie mieszaniny reakcyjnej w termostatowanym module bez ryzyka spadku odczytywanego w detektorze sygnału analitycznego, co mogłoby mieć miejsce w przypadku systemu, w którym próbka stykałaby się bezpośrednio z roztworem nośnika. Zastosowanie przewodów o stosunkowo dużej średnicy wewnętrznej (ok. 2 mm) oraz obecność pęcherzyków gazu sprzyjają realizacji przepływu w formie turbulentnej, niezbędnej do efektywnego mieszania składników próbki z reagentami. Wiąże się z tym ryzyko powstawania tzw. efektu przenoszenia (*carry-over*), polegającego na zanieczyszczeniu próbki badanej składnikami, jakie pozostały

w układzie pomiarowym (np. zaadsorbowały) po uprzednio badanej próbie. Ryzyko uzyskiwania w ten sposób wartości badanego parametru niezgodnych z wartością rzeczywistą minimalizuje się poprzez odpowiednią konfigurację programu analizy, tzn. uwzględniając w nim tworzenie segmentów z roztworem myjącym (np. sam nośnik) pomiędzy segmentami z próbkami badanymi.

SFA jest techniką charakteryzującą się stosunkowo dużym zużyciem reagentów oraz dużymi objętościami zużywanych próbek (rzędu 0,2–2 ml) w stosunku do innych technik przepływowych [3]. Czas analizy może wahać się od kilku do ok 30 minut (w zależności od czasu niezbędnego do zajścia reakcji). Konieczność wprowadzania pęcherzyków gazu i w konsekwencji – ich usuwania zanim dotrą do detektora komplikuje nieco architekturę aparatury pomiarowej. Ściśliwość gazu wprowadzonego do strumienia powoduje także powstawanie pulsacji i utrudnia prowadzenie w przepływie niektórych typów operacji (np. dializa, ekstrakcja). Mimo tych wad i stosunkowo wysokiego kosztu aparatury, technika ta znalazła jednak szerokie zastosowanie w wielu analizach rutynowych prowadzonych w laboratoriach, ciągle będąc atrakcyjną kosztowo alternatywą do przeprowadzania eksperymentów metodami klasycznymi.

Wstrzykowa analiza przepływowa (FIA) jest najprawdopodobniej najpopularniejszą techniką przepływową. W tym przypadku w strumieniu reakcyjnym nie ma pęcherzyków gazu, określona objętość próbki jest wstrzykiwana bezpośrednio do przepływającego strumienia nośnika, który jest sukcesywnie mieszany ze strumieniami reagentów [3] (rys. 8.2). Uzyskiwana dyspersja jest tu zjawiskiem pożądanym – służy do mieszania się analitu

i stosowanych odczynników, dzięki czemu w miarę przemieszczania się strefy próbki w stronę detektora rośnie w niej stężenie produktu poddawanego detekcji.



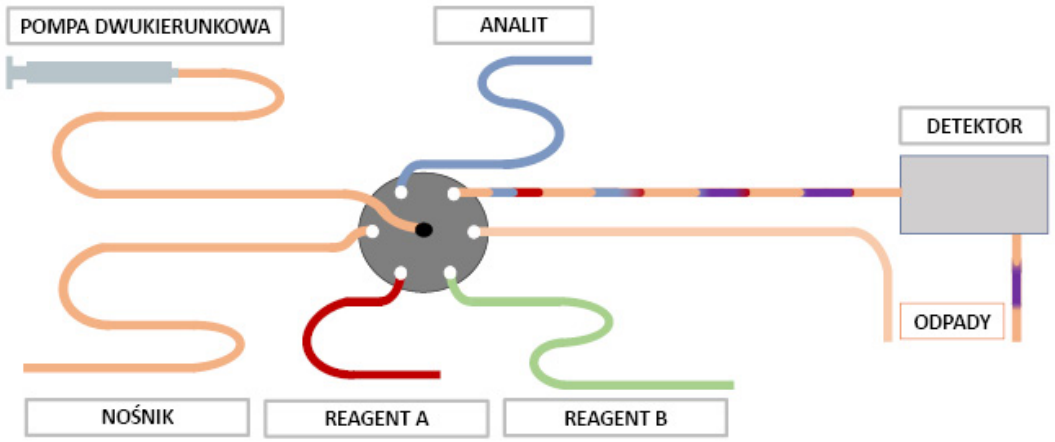
RYS. 8.2

Schemat systemu wstrzykowej analizy przepływowej; opracowanie własne na podstawie [3]

Wstrzykowa analiza przepływowa jest techniką charakteryzującą się stosunkowo niskim zużyciem reagentów oraz małymi objętościami zużywanych próbek (ok. 100 µl) [4]. Typowy czas analizy, wynoszący najczęściej poniżej minuty jest znacznie krótszy niż w przypadku SFA, dzięki czemu technika ta charakteryzuje się dużo większą przepustowością. Zrezygnowanie z wprowadzania pęcherzy gazu do strumienia pozwala także na redukcję średnic wykorzystywanych przewodów do ok. 500 µm, zapewniających warunki pozwalające na uzyskanie przepływu laminarnego w poszczególnych strumieniach.

Wstrzykowa analiza sekwencyjna (SIA) jest techniką, opracowaną przez twórców FIA jako alternatywa do tej metodologii

i opierającą się na zastosowaniu wieloportowych zaworów wstrzykowych. Przepływ w układzie jest generowany przez dwukierunkową pompę (strzykawkową) połączoną z zaworem, która wstępnie napełnia system roztworem nośnika [3, 4] (rys. 8.3). Następnie, próbka i niezbędne reagenty są za jej pomocą zasysane do strumienia poprzez otwieranie bądź zamykanie odpowiednich portów w zaworze. Po pobraniu wszystkich składników, jest otwierany kanał zaworu połączony hydraulicznie z detektorem, a pompa uruchamia przepływ pobranych składników w jego stronę. Zmiana kierunku działania pompy pomiędzy pobieraniem reagentów a ich przepływem do detektora pozwala na skuteczniejsze mieszanie się tych składników. Cały proces jest sterowany elektroniczne, a podłączenie aparatury do komputera umożliwia dodatkowo zbieranie i obróbkę danych.



RYS. 8.3

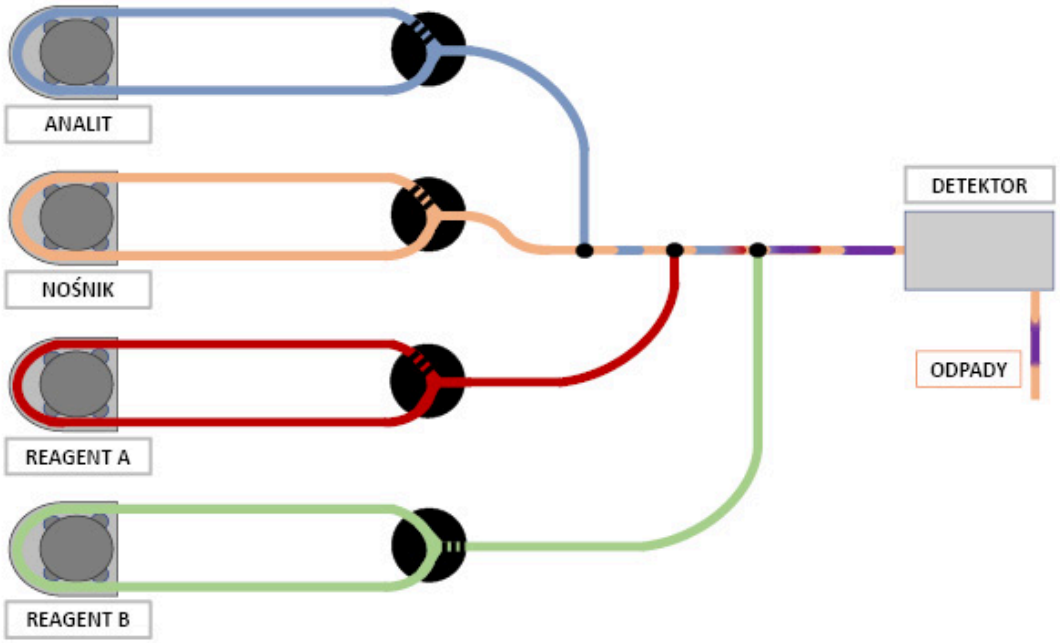
Schemat systemu wstrzykowej analizy sekwencyjnej z użyciem przykładowego zaworu sześciodrożnego; opracowanie własne na podstawie [3]

Wielkości zużywanych próbek oraz uzyskiwane czasy analiz w pomiarach techniką SIA są porównywalne do tych uzyskiwanych z użyciem wstrzykowej analizy przepływowej. W odróżnieniu od FIA, SIA pozwala jednak na znaczne zredukowanie objętości konsumowanych odczynników i generowanych odpadów, jak również na prowadzenie analiz wieloparametrowych tej samej próbki poprzez możliwość podłączenia do zaworu pojemników z różnymi reagentami i zastosowania różnych procedur analitycznych na tym samym urządzeniu. Głównym ograniczeniem liczby możliwych do zbadania parametrów jest liczba portów w zaworze. Najczęściej w praktyce laboratoryjnej spotyka się zawory sześcio- i ośmiodrożne, jednak w sprzedaży dostępne są zawory mające nawet po 20 portów.

Kolejną techniką jest wielotorowa wstrzykowa analiza przepływowa (*Multicommutated Flow Injection Analysis*, MCFIA). Systemy wielotorowe można sobie wyobrazić jako sieci tworzone przez przewody hydrauliczne, połączone za pomocą kontrolowanych komputerowo przełączników (tzw. komutatorów), np. zaworów elektromagnetycznych. Skomplikowanie budowy tych systemów pozwala na poszerzenie gamy ich potencjalnych zastosowań, poszczególne etapy analizy próbek mogą być bowiem dowolnie dobierane, niezależnie prowadzone i sterowane [5]. Jednym z najprostszych rozwiązań stosowanych w tego typu systemach jest przekierowanie strumienia przepływającego płynu, dokonywane za pomocą różnego typu zaworów. W prezentowanym na rys. 8.4 przykładzie roztwory nośnika, analizowanej próbki i reagentów są utrzymywane w ciągłym przepływie za pomocą pomp perystaltycznych. Ustawienia poszczególnych zaworów elektromagnetycznych decydują, czy poszczególne strumienie są

kierowane w stronę detektora, czy zawracane do zbiorników. W ten sposób próbka jest wprowadzana do strumienia nośnika, a kolejne reagenty są dodawane jako dodatkowe strumienie, okresowo dołączane do standardowej ścieżki przepływu. W podobny sposób strefa próbki może być przekierowywana do specyficznych przedziałów systemu, np. stref wyposażonych w systemy do zatężania, termostatowanych przedziałów z kontrolą temperatury, komór do przechowywania w trybie zatrzymania przepływu lub pętli reakcyjnych w celu umożliwienia całkowitego przereagowania składników próbki z dodanym regentem. Za pomocą oprogramowania sterującego, jest tworzony schemat procedury analitycznej: są definiowane poszczególne etapy analizy, które w systemach wykorzystujących informacje zwrotne mogą być modyfikowane w czasie rzeczywistym.

Wartości parametrów pracy wielotorowej wstrzykowej analizy przepływowej (objętości próbek, zużycie reagentów etc.) są zbliżone do parametrów pracy wstrzykowej analizy sekwencyjnej. Jednak w odróżnieniu od SIA, gdzie liczba możliwych do wykonania operacji jest ograniczana pośrednio przez liczbę dostępnych portów w zaworze, w przypadku MCFA można wprowadzać nawet skomplikowane procedury analityczne poprzez dodawanie kolejnych zaworów w punktach węzłowych. Główna zaleta tego typu systemów, jaką jest zastosowanie licznych zaworów elektromagnetycznych, może być jednocześnie dużą ich wadą. Tego typu podzespoły w trakcie pracy mogą ulegać nagrzewaniu, co z jednej strony może prowadzić do szybkiego ich zużycia, a z drugiej – niekorzystnie wpływać na analizowane próbki czy przebieg prowadzonych w systemie reakcji.



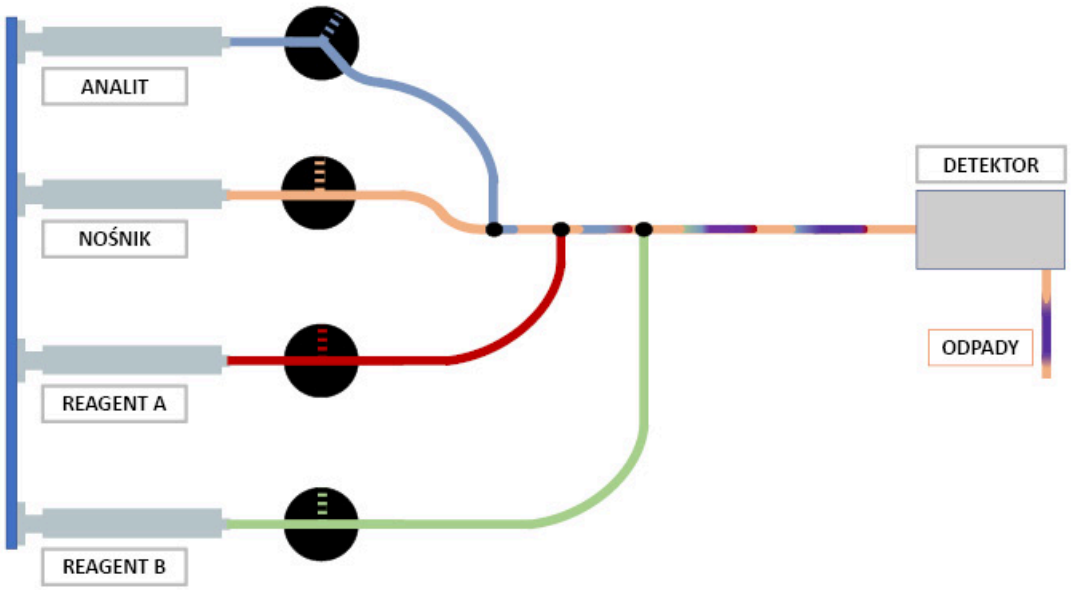
RYS. 8.4

Schemat systemu wielotorowej wstrzykowej analizy przepływowej; opracowanie własne na podstawie [3]

Na tle innych technik przepływowych, wielostrzykawkowa wstrzykowa analiza przepływowa (*Multisyringe Flow Injection Analysis*, MSFIA) jest techniką stosunkowo młodą – opracowana została dopiero pod koniec lat 90. XX wieku [6]. Koncepcja metody opiera się na zastosowaniu zespołu strzykawek, których tłoki są równocześnie poruszane za pomocą tego samego silnika krokowego. Mechanizm generowania przepływu jest więc analogiczny jak przy zastosowaniu wielokanałowej pompy perystaltycznej, jednak jest pozbawiony zasadniczej jej wady – nietrwałości delikatnych elementów składowych. Każda ze strzykawek jest połączona z zaworem elektromagnetycznym, kierującym przepływ w określonym kierunku – albo w stronę detektora, albo z powrotem do zbiornika z danym roztworem (rys. 8.5). Mieszanie badanej

próbki, nośnika i reagentów w odpowiednich stosunkach objętościowych uzyskuje się poprzez stosowanie strzykawek o odpowiednio dobranych średnicach wewnętrznych.

Zastosowanie strzykawek wykonanych z trwałych i odpornych chemicznie materiałów (np. PTFE) zamiast pomp perystaltycznych pozwala na rozszerzenie zakresu możliwych do wykonywania analiz o te wymagające użycia bardziej agresywnych odczynników czy rozpuszczalników organicznych.



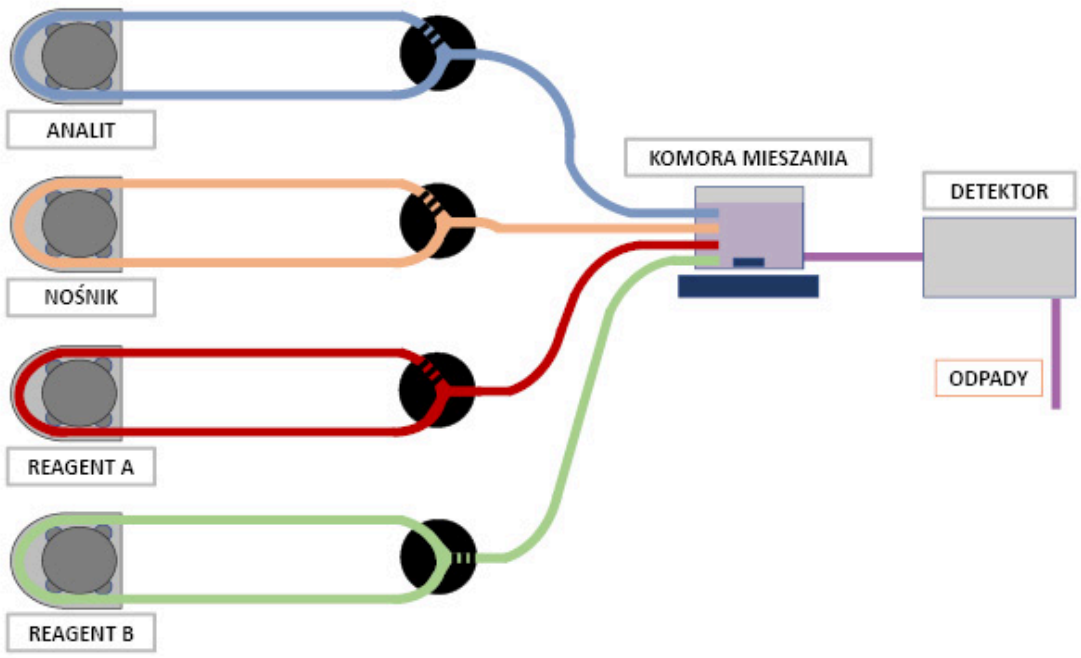
RYS. 8.5

Schemat systemu wielostrzykawkowej wstrzykowej analizy przepływowej; opracowanie własne na podstawie [3]

Inną metodą jest analiza przepływowa bezpośredniego wstrzyknięcia (*Batch-flow Injection Analysis*, BFIA). We wstrzykowych systemach przepływowych bezpośredniego wstrzyknięcia wymuszanie przepływu oraz próbkowanie odbywają się w analogiczny sposób jak w uprzednio opisanych metodach.

Odpowiednie reagenty są transportowane z wykorzystaniem pomp perystaltycznych, a dozowanie odbywa się z użyciem zaworów elektromagnetycznych. Zasadnicza różnica pomiędzy tym a omawianymi wyżej systemami polega na sposobie generowania sygnału analitycznego. W tym przypadku reakcja analityczna nie zachodzi w przepływie, poszczególne reagenty są w tym celu umieszczane w specjalnej komorze mieszania, często wyposażonej w mieszadło magnetyczne. Wytworzony produkt reakcji jest następnie transportowany do detektora lub mierzony bezpośrednio w komorze mieszania z użyciem zintegrowanego z tym modułem systemu do detekcji [7] (rys. 8.6).

Zastosowanie zaproponowanego hybrydowego systemu pozwala z jednej strony na zachowanie wysokiej przepustowości techniki, niskiego zużycia reagentów oraz małej ilości generowanych odpadów, charakterystycznych dla technik przepływowych, pozwalając jednocześnie na wydajne i szybkie prowadzenie nawet skomplikowanego procesowania próbki, wymagającego użycia wielu różnych reagentów i ściśle kontrolowanych warunków procesu. Dodatkowo, możliwość instalacji detektora bezpośrednio w komorze mieszania pozwala na wykorzystanie tej aparatury do automatyzowania analitycznych metod miareczkowych [8].



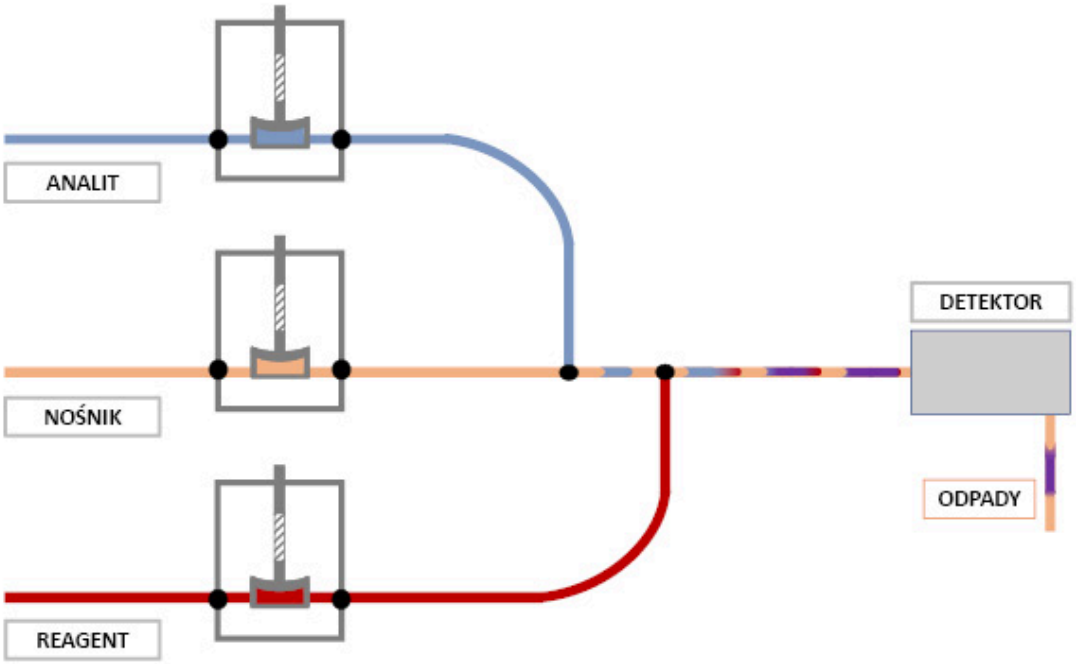
RYS. 8.6

Schemat systemu analizy przepływowej bezpośredniego wstrzyknięcia; opracowanie własne na podstawie [3]

Stosowane są również przepływowe systemy wielopompowe (*Multipumping Flow Systems*, MPFS). W przypadku wcześniej omawianych konstrukcji, do generowania przepływu nośnika i odpowiednich reagentów wykorzystywane są z reguły pompy perystaltyczne bądź strzykawkowe. Zastosowanie tych pierwszych ma miejsce przede wszystkim w układach wyposażonych w precyzyjne zawory wstrzykowe, co wynika z faktu, iż podzespoły te nie mają możliwości precyzyjnego dozowania przepływającego medium. W układach wstrzykowo-sekwencyjnych wykorzystuje się natomiast pompy strzykawkowe, w których przepływ jest już generowany z użyciem bardziej precyzyjnych silników krokowych. W odróżnieniu jednak od pompy perystaltycznej, która może jednocześnie wymuszać przepływ w kilku przewodach, jedna pompa

strzykawkowa może generować ruch płynu tylko w jednym przewodzie. Stanowi to duże ograniczenie w możliwościach konfiguracji konkretnego systemu do wielu zastosowań [9].

Zupełnie inną generację pomp stanowią mikropompy, które stanowią trzon konstrukcji przepływowych systemów wielopompowych. Mikropompa jest urządzeniem mającym możliwość precyzyjnego dozowania niewielkich objętości medium (3–50 µl) w porcjach wprowadzanych do układu z zadaną częstotliwością. Przewody z płynami pompowanymi przez poszczególne mikropompy mogą być skonfigurowane analogicznie jak w systemach wielotorowej analizy przepływowej i sterowane za pomocą zaworów elektromagnetycznych umieszczanych w poszczególnych punktach węzłowych (rys. 8.7). Dodatkowym elementem podlegającym sterowaniu są tutaj także same mikropompy, w przypadku których można na bieżąco modyfikować szybkość przepływu.



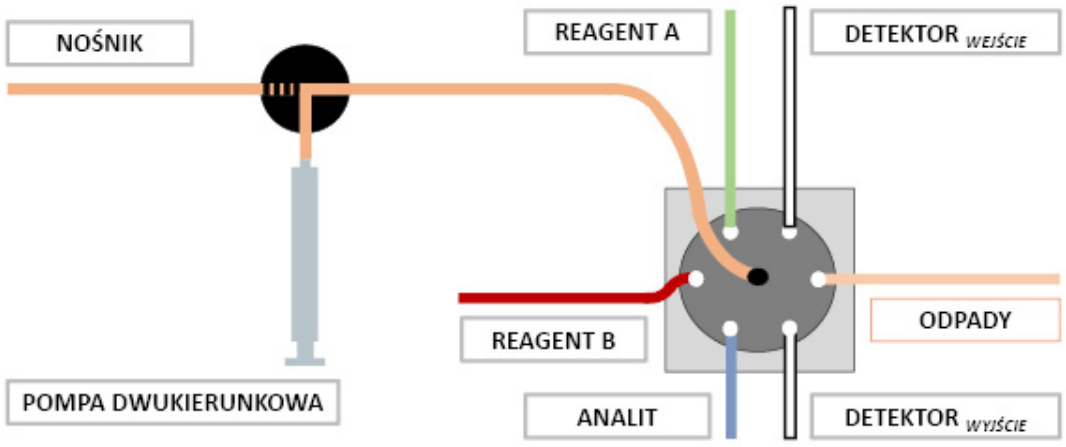
RYS. 8.7

Schemat przepływowego systemu wielopompowego; opracowanie własne na podstawie [10]

Niewątpliwą zaletą stosowania mikropomp jest ich niezawodność, wytrzymałość, niski koszt oraz duże możliwości konfiguracji, włączając w to także zastosowanie w przenośnych systemach miniaturowych [3].

Nowatorskie podejście do analizy przepływowej zaprezentował Ruzicka, proponując układ typu „laboratorium w zaworze" (*lab-on-valve*, LOV) [11]. Zaproponowane przez niego rozwiązanie polegało na integracji kluczowych elementów układu, odpowiadających za dokonywane na próbce operacje (np. mieszanie, ekstrakcja, przeprowadzanie reakcji w trybie zatrzymania przepływu) w module połączonym bezpośrednio z portem wstrzykowym zaworu (rys. 8.8). Porcje poszczególnych reagentów są pobierane i transportowane przez odpowiednie przedziały systemu za pomocą dwukierunkowej pompy.

Wykonanie modułu LOV z trwałego przezroczystego polimeru (np. PMMA) otwiera dodatkową możliwość bezpośredniego umieszczenia w kanałach detektorów optycznych i wykonywanie pomiarów bezpośrednio „w zaworze". Dostępne komercyjnie chipy z fabrycznie przygotowanymi kanałami dają możliwość pewnej konfiguracji w zakresie liczby i rodzajów podłączonych elementów systemu. Główne wady systemów LOV, np. stosunkowo długi czas analizy w porównaniu z klasyczną wstrzykową analizą przepływową, wynikają bezpośrednio z zastosowania w nich pomp strzykawkowych.



RYS. 8.8

Schemat systemu typu „laboratorium w zaworze”; opracowanie własne na podstawie [3]

8.1.4 Wykorzystanie sensorów w klasycznych układach przepływowych

Kluczowym elementem każdego stosowanego w chemii systemu pomiarowego jest odpowiedni system detekcyjny (np. czujnik), przekształcający informację chemiczną na sygnał elektryczny, dający się przedstawić liczbowo i odpowiednio zinterpretować. W związku z dynamicznym rozwojem grupy technik przepływowych, w ostatnich dziesięcioleciach duży nacisk był kładziony także na opracowywanie nowych i optymalizowanie już istniejących metod detekcji pod kątem możliwości stosowania ich w warunkach przepływu. Najwięcej zastosowań znalazły grupy czujników optycznych oraz

elektrochemicznych ze względu na swoją trwałość, odporność, dostępność gotowych rozwiązań technologicznych a także bardzo dobre parametry pracy, takie jak czas odpowiedzi czy powtarzalność.

a) detekcja optyczna

W pomiarach optycznych wykorzystuje się właściwości badanych substancji związane ze zdolnością danej substancji do oddziaływania z falą elektromagnetyczną, najczęściej do absorpcji lub emisji promieniowania o określonej długości fali, jego rozpraszania, załamania, dyfrakcji, czy polaryzacji. Oprócz detektora umieszczonego w urządzeniu konstrukcja układu pomiarowego w większości przypadków musi uwzględniać także źródło światła. Obecnie jako źródło promieniowania najczęściej wykorzystuje się diody emitujące światło (*light-emitting diode*, LED) oraz lasery gazowe i diodowe. Diody LED to monochromatyczne źródła światła, charakteryzujące się bardzo dobrymi właściwościami fizycznymi: wysoką stabilnością emitowanego promieniowania bez wykazywania jednoczesnego silnego nagrzewania się źródła. Zdobyły one dużą popularność także dzięki niskiej cenie, łatwej dostępności, czy niskiemu poborowi prądu (nawet poniżej 1 mA). Spośród diod dostępnych komercyjnie bez trudu można dobrać źródło światła, emitujące promieniowanie o wybranej długości fali ze stosunkowo szerokiego zakresu spektralnego (od ok. 250 nm do ok. 700 nm) [12]. Źródła laserowe, w odróżnieniu od diod LED, wykazują szerszy zakres możliwości pomiarowych. Ogromną zaletą źródeł laserowych jest to, że dają możliwość wyboru długości fali emitowanego światła z pewnego ograniczonego zakresu. Niektóre aplikacje pozwalają także na prowadzenie pomiarów przy dwóch długościach fali jednocześnie. Oprócz źródeł monochromatycznych bardzo często

stosuje się również lampy deuterowe, emitujące światło w zakresie ultrafioletu oraz lampy wolframowe i ksenonowe, emitujące w światło w zakresie widzialnym.

W pomiarach optycznych najczęściej mierzy się intensywność promieniowania emitowanego przez analit bądź określa ilość światła przez niego zaabsorbowanego. W analizach przepływowych wykorzystuje się w tym celu następujące detektory:

- detektory fotometryczne:
  – kolorymetry,
  – spektrofotometry;
- detektory luminescencyjne:
  – fluorymetryczne,
  – chemiluminescencyjne,
  – spektrometry fluorescencji atomowej.

W wielu przypadkach stosowane detektory nie mają bezpośredniego kontaktu ze środowiskiem próbki. Wiązka światła jest wówczas przepuszczana przez badany element albo z użyciem światłowodu zintegrowanego z układem przepływowym, albo podczas przepływu próby przez specjalny element – celę pomiarową, najczęściej wykonaną ze szkła (pomiary w zakresie światła widzialnego) lub kwarcu (pomiary w zakresie UV). Takie systemy są stosowane w przypadku, gdy badane substancje wykazują charakterystyczne właściwości optyczne, dzięki którym mogą być w prosty sposób odróżnione od matrycy próbki. W przypadku, gdy badany analit sam nie wykazuje aktywności optycznej, można stosować pomiary pośrednie, z wykorzystaniem specjalnych wskaźników, specyficznie oddziałujących z badaną substancją i wykazujących zmianę aktywności optycznej pod

wpływem tego odziaływania. Tego typu indykatory najczęściej unieruchamiane są w membranach, żelach, czy w cienkich warstwach polimerów, które z jednej strony łączy się powierzchnią np. światłowodu, a z drugiej eksponuje do środowiska próbki badanej [13].

b) detekcja elektrochemiczna

Detektory używane do pomiarów zjawisk elektrochemicznych znalazły szerokie zastosowanie w chemii analitycznej głównie dzięki niskiej cenie, odporności, stabilności oraz szerokim możliwościom wprowadzania różnorodnych modyfikacji chemicznych i biologicznych, pozwalających na selektywne oddziaływanie czujnika z wybranym analitem. Ich dużą zaletą jest możliwość prowadzenia pomiarów w zawiesinach, w przypadku których niemożliwe są pomiary optyczne. Daje im to przewagę w analizach próbek środowiskowych (np. analizy składu ścieków), czy biologicznych (np. analizy krwi). W odróżnieniu od detektorów optycznych, sensory elektrochemiczne wymagają bezpośredniego kontaktu z badaną próbką. Ten kontakt detektora ze składnikami środowiska pomiarowego, zwłaszcza w przypadku prowadzenia analiz próbek o skomplikowanych matrycach, może wpływać negatywnie na czas ich przydatności do użytku [12]. Do najczęściej wykorzystywanych w układach przepływowych zaliczamy następujące grupy detektorów:

- konduktometryczne,
- potencjometryczne,
- woltamperometryczne i amperometryczne.

Detektory konduktometryczne charakteryzują się najniższą selektywnością, dlatego też możliwości ich wykorzystania są dosyć

ograniczone. Dużo szerzej są wykorzystywane detektory potencjometryczne. Pozwalają one na dokonywanie szybkich pomiarów w stosunkowo szerokich zakresach stężeń analitów. W ich przypadku kontakt z próbką badaną w analizatorach przepływowych odbywa się albo w dedykowanych celach pomiarowych (w przypadku elektrod „tradycyjnych", podłączanych do układu za pomocą specjalnych adapterów) albo bezpośrednio w przepływie (w przypadku stosowania wersji zminiaturyzowanych, dedykowanych do analiz przepływowych). W przypadku pomiarów woltamperometrycznych i amperometrycznych coraz częściej stosowane są miniaturowe elektrody otrzymywane techniką sitodruku, nie tylko pozwalające na miniaturyzację systemów, ale także znacznie bezpieczniejsze w obróbce i użytkowaniu niż popularne dotychczas materiały rtęciowe [12].

8.1.5
Wykorzystanie sensorów w mikrosystemach „Lab-on-a-chip"

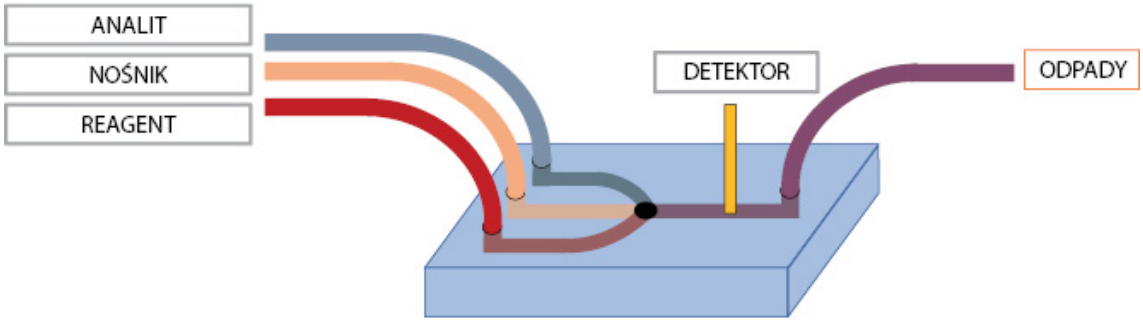
Postęp, jaki dokonywał się w ciągu ostatnich dziesięcioleci w dziedzinach takich, jak mechanika, materiałoznawstwo czy elektronika, umożliwiał systematyczny rozwój istniejących technik analitycznych: poprawę uzyskiwanych parametrów pracy, miniaturyzację stosowanej aparatury, automatyzację pracy oraz rozwój systemów sterowania komputerowego i elektronicznej (często automatycznej) obróbki uzyskiwanych wyników. Konstruktorzy sukcesywnie zmierzali w kierunku tworzenia rozwiązań

jak najbardziej „samodzielnych”, wymagających raczej nadzoru aniżeli dużego nakładu pracy operatora, tzw. kompletnych systemów analitycznych (*Total Analysis System*, TAS) [14]. TAS można ogólnie określić jako urządzenie, które w sposób automatyczny realizuje w całości daną analizę chemiczną. Operacje wykonywane przez system obejmują wszystkie niezbędne etapy analizy – począwszy od pobrania reprezentatywnej próbki, poprzez jej transport i wstępną obróbkę (roztwarzanie, rozcieńczanie, zatężanie, filtracja, ekstrakcja etc.), aż po ewentualne przeprowadzenie niezbędnych reakcji i detekcję produktu.

W ostatnich latach bardzo silnie rozwija się technologia miniaturowych systemów analitycznych (*Micro Total Analysis Systems*, μTAS), w których zużycie próbki i reagentów, a także objętość wytwarzanych odpadów są jeszcze wyraźniej redukowane niż ma to miejsce w standardowych układach przepływowych [15]. Koncepcja ta określana jest także mianem *Lab-on-a-chip*, co odzwierciedla ideę przeskalowania konwencjonalnej analityki do poziomu mikro- lub nawet nano-.

Podstawę konstrukcji urządzeń mikroprzepływowych stanowią specjalne podłoża – płytki z miniaturowymi kanałami przepływowymi o średnicach rzędu 10–300 μm, uzyskanymi np. za pomocą technik fotolitografii [16] (rys. 8.9). Wytworzone kanały mogą tworzyć różne konfiguracje – mogą się w odpowiednich miejscach krzyżować bądź rozdzielać, są możliwe miejscowe zmiany kształtu lub wielkości przekroju poszczególnych kanałów, a także tworzenie specjalnych komór, służących np. do mieszania reagentów, przeprowadzania reakcji lub prowadzenia hodowli komórkowych [15, 17]. Powierzchnie wewnętrzne wybranych fragmentów kanałów mogą

być dodatkowo modyfikowane (np. przez immobilizację katalizatorów, selektywnych przeciwciał itd.), co daje duże możliwości sterowania przebiegiem prowadzonego w mikroskali procesu [16].



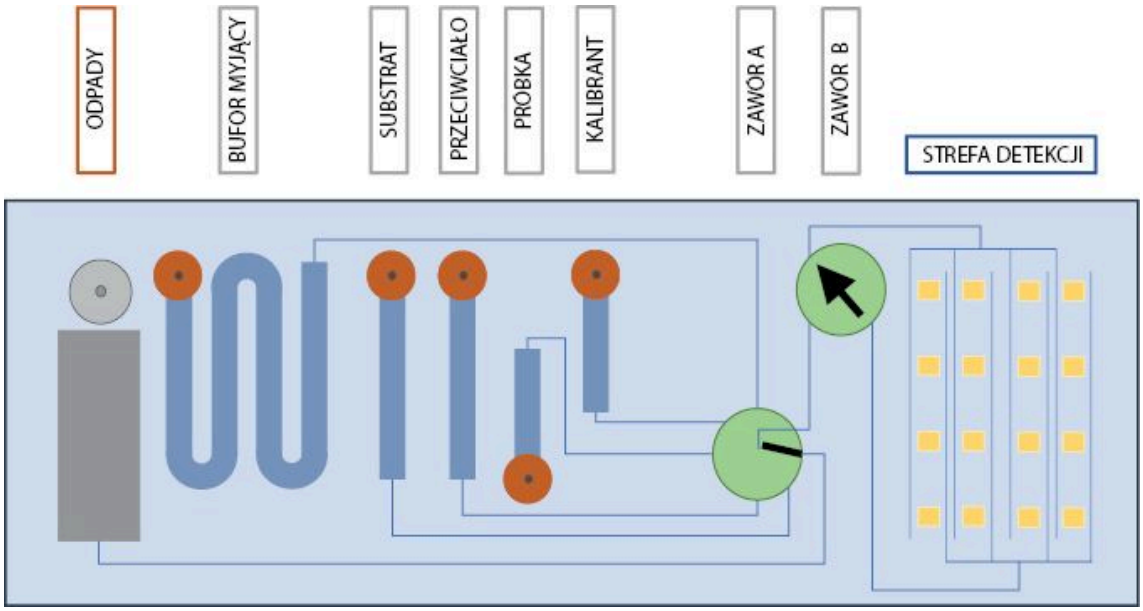
RYS. 8.9

Schemat miniaturowego kompletnego systemu analitycznego; opracowanie własne

Detektorami najczęściej używanymi w konstrukcjach typu μTAS są detektory optyczne wykorzystujące zjawisko wzbudzanej laserowo fluorescencji (*Laser Induced Fluorescence*, LIF). Popularne w powszechnie stosowanych w przemyśle technikach „makro" (wysokosprawna chromatografia cieczowa, elektroforeza kapilarna) detektory optyczne w zakresie UV-VIS okazały się w zastosowaniach „mikro" dużo mniej czułe, co pociągnęło za sobą konieczność stosowania dodatkowych elementów wzmacniających sygnał generowany w mikroukładzie [18]. Alternatywą do detektorów optycznych są detektory elektrochemiczne, których zminiaturyzowane wersje mogą być z powodzeniem integrowane z układami mikroprzepływowymi. Tego typu konstrukcje były już z powodzeniem wykorzystywane w analizach wieloparametrowych

bioanalitów, np. jednoczesnym oznaczaniu glukozy, kwasu moczowego, kwasu askorbinowego i paracetamolu [19].

Ciekawy przykład konstrukcji mikroukładu pomiarowego, wykorzystującego sensory chemiczne stanowi amperometryczny immunosensor służący do wykrywania markerów raka: antygenu krążeniowo-embriotycznego (*carcinoembryonic antygen*, CEA), antygenu raka 15-3 (*cancer antigen 15-3*, CA15-3) oraz antygenu swoistego dla prostaty (*prostate specific antigen*, PSA) [20]. Zaproponowany mikroukład składa się z dwóch stref: strefy obróbki próbki oraz strefy detekcji. W pierwszej umieszczono pięć mikrokomór, służących do przechowywania próbki oraz niezbędnych odczynników. Zbiorniki są połączone ścieżkami hydraulicznymi, ograniczonymi przegrodami. Przepływ poszczególnych reagentów jest wymuszany poprzez przyłożenie ciśnienia za pomocą programowalnej pompy strzykawkowej i prowadzi przez dwa zawory w kierunku strefy detekcji. Ustawienie pierwszego zaworu (zawór A) decyduje o tym, z której komory z reagentami następuje przepływ, ustawienie drugiego zaworu (zawór B) jest związane z tym, czy do sekcji detekcji jest kierowany roztwór wzorcowy, czy próbka. W strefie detekcji znajduje się zestaw 16 różnych elektrod pracujących, umieszczonych w oddzielnych komorach (rys. 8.10).



RYS. 8.10

Schemat konstrukcji układu typu µTAS do badania markerów nowotworowych; opracowanie własne na podstawie [20]

8.2 Zastosowania przepływowych układów (bio)analitycznych

Analiza przepływowa jest stosunkowo prostą i niedrogą techniką, wykorzystującą powszechnie dostępne elementy oprzyrządowania. Do jej głównych zalet należy zaliczyć wysoką przepustowość, krótkie czasy analiz, niskie zużycie reagentów, niewielkie objętości zużywanych próbek. Nieskomplikowane konstrukcje stosowanej aparatury, duże możliwości wprowadzania zmian konfiguracji czy rozbudowy systemu oraz możliwości automatyzacji prac miały

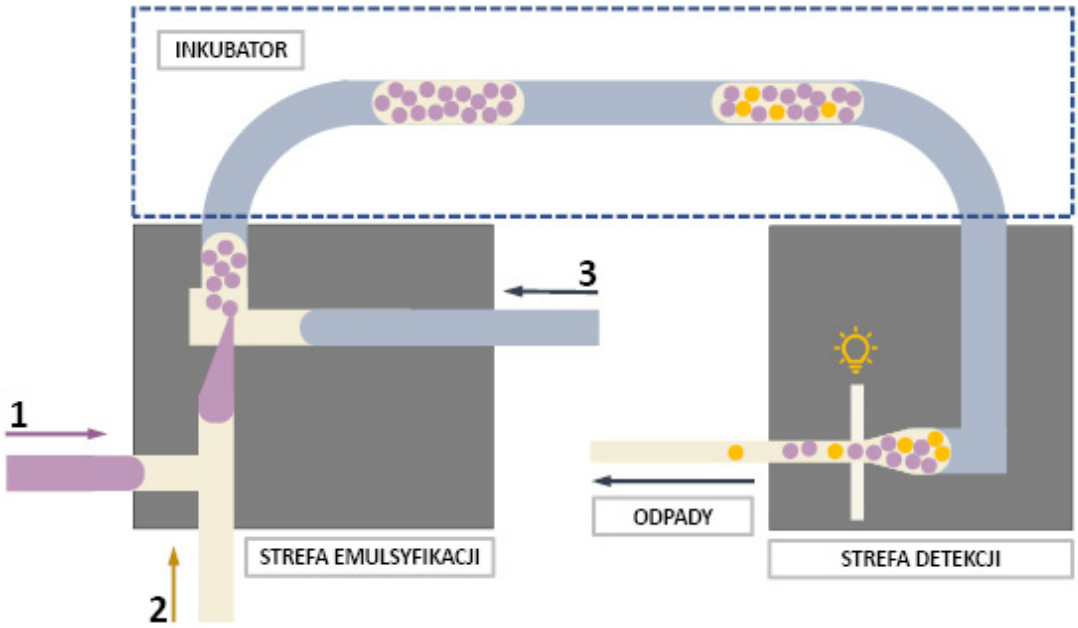
ogromny wpływ na wszechstronność dziedzin, w jakich analizatory przepływowe znalazły swoje zastosowanie praktyczne. Szczególnie popularne stały się z tych laboratoriach i zakładach, w których są realizowane badania dużych ilości próbek poddawanych wybranym oznaczeniom, minimalizując tym samym zapotrzebowanie na wykwalifikowany personel laboratoryjny.

8.2.1
Zastosowania okołomedyczne sensorów zintegrowanych z układami przepływowymi

Bodźcem do rozpoczęcia dynamicznego rozwoju przepływowych technik analitycznych było rosnące zapotrzebowanie na wysokoprzepustowe techniki do zastosowania w analityce medycznej. Z biegiem lat, wraz z rozwojem wiedzy medycznej, lista diagnozowanych parametrów stale się rozszerzała, powiększając zapotrzebowanie na tanie, szybkie i możliwie wysoko zautomatyzowane techniki analityczne. Układy i mikroukłady przepływowe znalazły zastosowanie w diagnozowaniu chorób, czy monitorowaniu zdrowia pacjentów [21]. Zwłaszcza systemy z detekcją elektrochemiczną, wykorzystującą potencjometryczne sensory jonoselektywne, są bardzo szeroko stosowane w analizach próbek biologicznych ze względu na dużą selektywność tej grupy czujników w stosunku do pozostałych składników matrycy próbki [22]. Na rynku zaczynają pojawiać się już także pierwsze rozwiązania sprzętowe, wykorzystujące techniki przepływowe do

rozpoznawania chorobotwórczych mikroorganizmów – bakterii, wirusów i grzybów, czy prowadzenia szybkich testów antybiotykoodporności nieznanych patogenów w warunkach klinicznych [23, 24].

Ciekawym zastosowaniem mikroukładów przepływowych do badań materiału biologicznego są analizy oporności bakterii, zaproponowane w grupie Garsteckiego [23]. Opracowana metoda pomiaru wrażliwości na antybiotyki na poziomie pojedynczych komórek bakteryjnych może znaleźć szerokie zastosowania kliniczne, pozwala bowiem w stosunkowo szybki sposób dobrać odpowiedni antybiotyk oraz oszacować niezbędną dawkę w przypadku walki z nieznanym patogenem. W trakcie eksperymentu są wytwarzane kropelki emulsji, oddzielane porcjami trzeciej, niemieszającej się z emulsją fazy, tworząc w ten sposób przedziały podobne do wagonów pociągu. Dzięki odpowiedniej konfiguracji mikrosystemu przepływowego jest możliwe takie zaprojektowanie eksperymentu, aby każda kropla emulsji reprezentowała nieco inne (ale ściśle kontrolowane) warunki środowiska, np. inną dawkę antybiotyku (rys. 8.11).



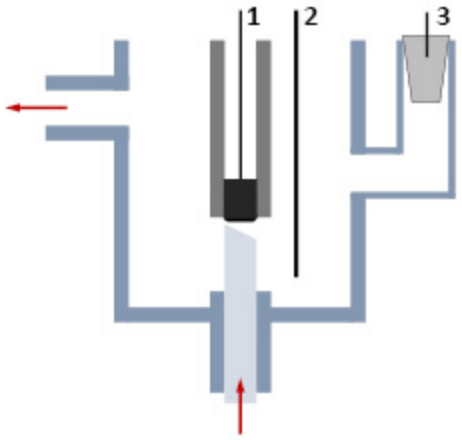
RYS. 8.11

Schemat konstrukcji układu mikroprzepływowego do badania oporności bakterii (1,2 – strumienie cieczy podlegających emulsyfikacji, 3 – strumień cieczy niemieszającej się z emulsją); opracowanie własne na podstawie [23]

Zastosowanie niemieszających się ze sobą substancji pozwala na prowadzenie nawet długotrwałych inkubacji, często niezbędnych w badaniach wzrostu mikroorganizmów. Po inkubacji każda kropla jest poddawana analizie z użyciem detekcji optycznej (fluorescencja), pozwalającej oszacować wpływ antybiotyku na dany szczep bakterii.

Jednym z ciekawych zastosowań układu przepływowego do badań parametrów biologicznych jest także sensor choliny [25], zaproponowany w 2019 r. przez Tvorynska i in. Cholina jest prekursorem niezwykle ważnego w ludzkim organizmie neuroprzekaźnika – acetylocholiny. Niedobory acetylochoniny prowadzą do licznych zaburzeń neurologicznych, włączając w to choroby Alzhaimera czy Parkinsona, czy komplikacji w trakcie ciąży.

Wykrywanie choliny w zaproponowanym systemie opiera się na amperometrycznym monitorowaniu ilości tlenu, jaka jest konsumowana w trakcie zachodzenia reakcji enzymatycznego utleniania choliny przez oksydazę choliny. Enzym został zaimmobilizowany na porowatym złożu i umieszczony w reaktorze, w związku z czym reakcja enzymatyczna oraz pomiar efektów jej zachodzenia były rozdzielone w przestrzeni. W pracy porównano dwa detektory do pomiarów elektrochemicznych sprzężonych z FIA, wykorzystujących sensory czułe na tlen. Jednym z nich było ogniwo typu *wall-jet* z pracującą srebrną elektrodą z litego amalgamatu pokrytego warstwą rtęci, a drugim ogniwo przepływowe z rurowym detektorem z polerowanego stałego amalgamatu srebra. Znacznie lepszymi parametrami pracy charakteryzował się jednak system wykorzystujący ogniwo typu *wall-jet* (rys. 8.12).



RYS. 8.12

Schemat budowy ogniwa typu *wall-jet* do pomiarów choliny w układzie przepływowym (1 – elektroda pracująca, 2 – elektroda pomocnicza, 3 – elektroda odniesienia), opracowanie własne na postawie [25]

8.2.2
Zastosowanie sensorów zintegrowanych z układami przepływowymi w badaniach środowiskowych

Coraz silniej na świecie są akcentowane dążenia poszczególnych rządów czy przedsiębiorstw do zaimplementowania koncepcji zrównoważonego rozwoju [26]. Doprowadziło to do powstania pojęcia zielonej chemii [27], czyli idei projektowania i prowadzenia procesów chemicznych w taki sposób, aby maksymalnie ograniczyć zużycie odczynników i generowanie odpadów, przede wszystkim substancji szkodliwych dla ludzi, zwierząt i ogólnie – środowiska. Ogromną rolę w monitorowaniu stanu środowiska odgrywają analizy chemiczne wody, powietrza i gleby. Analizy gleby, fragmentów tkanek roślinnych czy zwierzęcych i innych próbek stałych o bogatej matrycy mogą być trudne do zaimplementowania w systemach analizy przepływowej. Jednak próbki ciekłe, a zwłaszcza próbki wody, idealnie nadają się do zautomatyzowanego analizowania z użyciem CFA [28], umożliwiając jednocześnie skuteczne wdrażanie do praktyki laboratoryjnej założeń zielonej chemii [29].

Szacuje się, że zastosowania w ogólnie pojętych analizach środowiskowych odpowiadają za prawie jedną trzecią całkowitego zapotrzebowania przemysłu na analizatory przepływowe [30]. Są one stosowane głównie do analizy poziomu zanieczyszczeń wody, skuteczności procesów uzdatniania wód naturalnych do zastosowań produkcyjnych i komunalnych czy wydajności zaaplikowanych metod

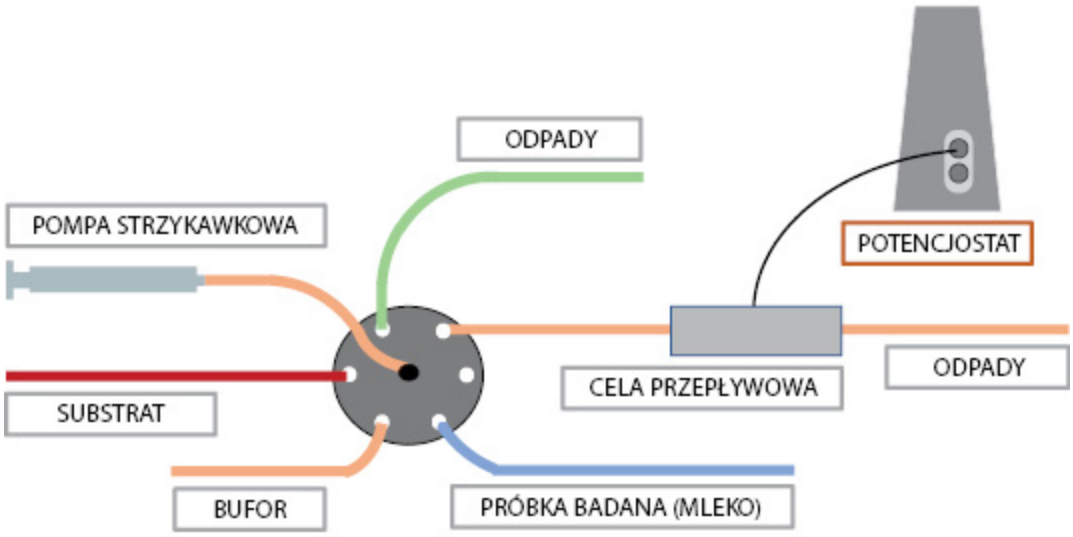
oczyszczania wytworzonych ścieków [28, 31]. Na rynku funkcjonuje wielu dostawców analizatorów przeznaczonych do analizy zawartości w wodzie poszczególnych jonów nieorganicznych (chlorki, siarczany(VI), fosforany(V), azotany(V), azotany(III), fluorki, cyjanki, jony amonowe itd.) jak i bardziej złożonych substancji chemicznych (aminy, fenol i jego pochodne, detergenty, pozostałości pestycydów itd.). Procedury analityczne odtwarzane za pomocą poszczególnych operacji realizowanych przez aparaturę pomiarową odpowiadają standardowym przepisom analitycznym, zgodnym z wytycznymi norm dotyczących standardów jakości wody. Obecnie coraz większe zainteresowanie wzbudzają urządzenia modułowe, przystosowane do prowadzenia analiz wieloparametrycznych, głównie z wykorzystaniem stosunkowo uniwersalnych metod detekcji: spektrofotometrycznej lub potencjometrycznej z membranowymi elektrodami jonoselektywnymi.

8.2.3
Zastosowanie sensorów zintegrowanych z układami przepływowymi w przemyśle

Możliwość automatyzacji oznaczeń jest krytycznym wymaganiem stawianym technikom analitycznym wykorzystywanym w praktyce przemysłowej w kontroli jakości surowców i produktów oraz monitoringu przebiegu procesów. Szczególnie istotne jest to w zakładach produkcji farmaceutycznej, funkcjonujących w reżimie Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (*Good Laboratory Practice*, GLP)

i Dobrej Praktyki Wytwarzania (*Good Manufacturing Practice*, GMP), w przypadku których spełnienie wymogu wytwarzania powtarzalnych partii produktów o bardzo wysokiej jakości musi być potwierdzone na drodze prowadzonych na dużą skalę analiz kontroli jakości. Oprócz rozdzielczych technik analizy przepływowej, takich jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia gazowa (GC), czy elektroforeza kapilarna (CE), w praktyce przemysłowej duże znaczenie mają także omawiane w niniejszym rozdziale realizowane w przepływie techniki nie rozdzielcze [32].

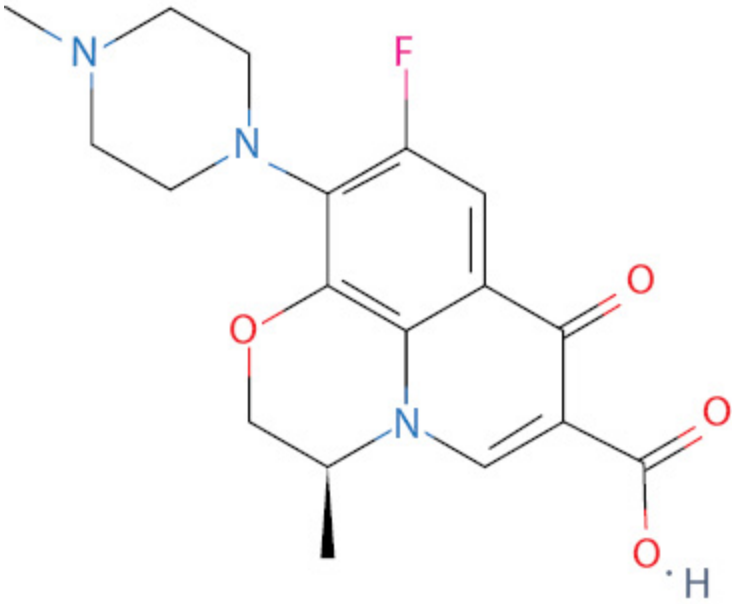
Jednym z takich zastosowań jest układ przepływowy wyposażony biosensor do analizy pozostałości pestycydów w mleku, zaproponowany przez Mishra i in. [33]. Przepływ jest tu generowany z użyciem modułowej pompy strzykawkowej, podłączonej do wieloportowego zaworu wstrzykowego. Pomiar elektrochemiczny jest dokonywany z użyciem elektrod węglowych otrzymanych metodą sitodruku i pozwala na szybkie (ok. 15 min) uzyskiwanie wyników w badaniu próbki biologicznej o stosunkowo skomplikowanej matrycy, jaką jest mleko (rys. 8.13). Element biologiczny sensora stanowią 3 genetycznie modyfikowane enzymy na wzór acetylocholinoesterazy, zaimmobilizowane na powierzchni elektrody i odpowiadające za reakcję ze znajdującymi się w próbce pestycydami i generowanie sygnału analitycznego.



RYS. 8.13

Schemat konstrukcji systemu do badania zawartości pestycydów w próbkach mleka, opracowanie własne na podstawie [33]

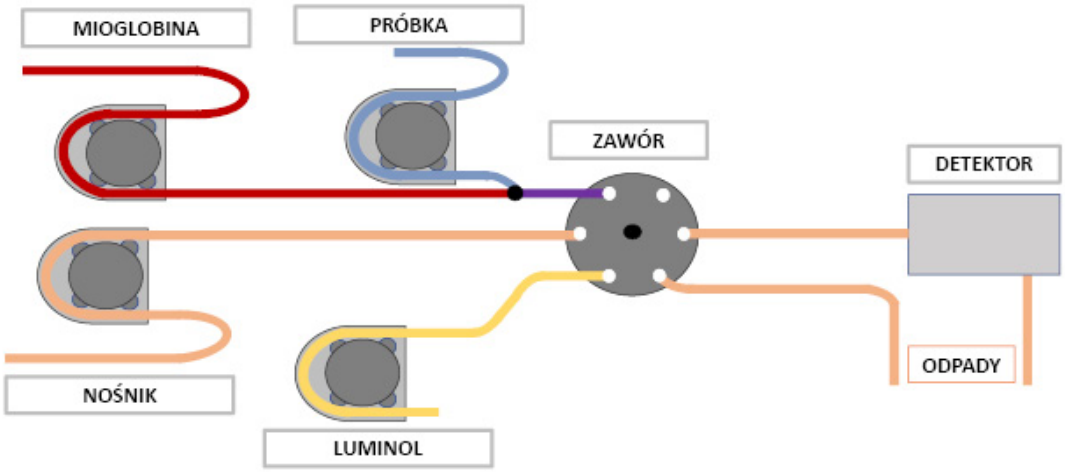
Jednym z przykładów produkcji przemysłowej, w której zastosowanie znalazła analiza przepływowa jest także wytwarzanie lewofloksacyny. Jest to syntetyczny lek, fluorowana pochodna chinolonu o udowodnionym działaniu przeciwbakteryjnym (rys. 8.14). Antybiotyk ten jest skuteczny zarówno w walce przeciw bakteriom Gram-dodatnim, jak i Gram-ujemnym, stanowiąc popularnie stosowany preparat w leczeniu zapalenia płuc, ostrego zapalenia oskrzeli czy zatok szczękowych oraz zakażeń dróg moczowych. Jest jedną z substancji czynnych umieszczonych na wzorcowej liście podstawowych środków leczniczych Światowej Organizacji Zdrowia [34].



RYS. 8.14
Struktura lewofloksacyny [35]

Najpopularniejszą techniką służącą do oznaczania lewofloksacyny w preparatach farmaceutycznych i próbkach biologicznych jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Mogą być w tym celu z powodzeniem stosowane także inne techniki: spektrofotometryczne, fluorymetryczne, spektrometria mas, elektroforeza kapilarna, czy spektroskopia rezonansu magnetycznego. Opracowana w zespole Shao [36] procedura wykonywania szybkich pomiarów zawartości tej substancji z użyciem techniki analizy przepływowej sprzężonej z detektorem chemiluminescencyjnym okazała się atrakcyjną kosztowo alternatywą dla znanych metod (rys. 8.15). Zaproponowana procedura analityczna wykorzystuje zjawisko katalizowania przez mioglobinę reakcji utleniania luminolu przez nadtlenek wodoru, prowadzącej do powstania produktu wykazującego chemiluminescencję. Lewofloksacyna jest inhibitorem tej interakcji,

dlatego można badać pośrednio jej zawartość, mierząc spadek chemiluminescencji mieszaniny luminolu i mioglobiny.



RYS. 8.15
Układ pomiarowy do badania zawartości lewofloksacyny w próbkach biologicznych; opracowanie własne na podstawie [36]

W trakcie przeprowadzonych badań wykazano wysoką czułość opracowanej metody oraz szeroki zakres uzyskiwanej odpowiedzi dynamicznej o liniowym charakterze.

8.3 Podsumowanie

Potrzeba miniaturyzacji i automatyzacji prowadzonych pomiarów jest coraz silniej zaznaczającym się trendem w nowoczesnej chemii analitycznej. Pociąga to za sobą stałe ulepszanie i dostosowywanie aparatury pomiarowej do przeprowadzania analiz z jak najmniejszym

udziałem wykwalifikowanego personelu, a jednocześnie dających wiarygodne i powtarzalne wyniki pomiarów. Z drugiej strony coraz wyższe wymagania dotyczące jakości i czystości stawiane wytwarzanym w przemyśle produktom czy wodzie przeznaczonej do picia stanowią ciągle żywe źródło zapotrzebowania na nowe metody analityczne oraz nowe techniki pomiarowe, pozwalające na redukcję ilości zużywanych odczynników oraz produkowanych ścieków, wpisujące się w trend *zielonej chemii*. Niesłabnącą popularnością w zastosowaniach środowiskowych i przemysłowych cieszą się techniki przepływowe, w przypadku których w stosunkowo prosty sposób można zaimplementować poszczególne etapy obróbki próbki w systemie pomiarowym.

Na szczególną uwagę zasługują tutaj zminiaturyzowane układy pomiarowe, których zastosowanie otwiera szerokie spektrum nowych zastosowań, zwłaszcza w dziedzinie diagnostyki medycznej, gdzie niezmiernie istotne jest maksymalne ograniczenie objętości próbek niezbędnych do przeprowadzenia analiz. Już teraz są dostępne komercyjnie systemy pomiarowe wykorzystujące mikroukłady przepływowe do badania wybranych parametrów zdrowotnych, w niedalekiej przyszłości można się więc spodziewać dynamicznego rozwoju tego obszaru. Można sobie wyobrazić, że dzięki rozwojowi tego obszaru nauki, w stosunkowo niedługim czasie przeprowadzanie szybkiej podstawowej diagnostyki bezpośrednio w gabinecie lekarskim, lub nawet samodzielnie w domu, stanie się standardem.

Literatura

1. Rocha F.R.P., Zagatto E.A.G., „Flow analysis during the 60 years of Talanta”, *Talanta,* 2020, **206**, 1–7.
2. Trojanowicz M., „Flow Chemistry in Contemporary Chemical Sciences: A Real Variety of Its Applications”, *Molecules*, 2020, **25** (6), 2–52.
3. Cerda V., Ferrer L., Avivar J., Cerda A., „Chapter 1. Evolution and Description of the Principal flow Techniques” w: *Flow Analysis. A Practical Guide*, Elsevier B.V., Amsterdam 2014, s. 1–42.
4. Šimková D., Labuda J., „Electrochemical DNA Biosensors and Flow-Through Analysis. A Review”, *Curr. Anal. Chem.*, 2011, **7** (1), 2–7.
5. Rocha F.R.P., Reis B.F., Zagatto E.A.G., Lima J.L.F.C., Lapa R.A.S., Santos J.L.M., „Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends”, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **468**, 119–131.
6. Cerda V., Ferrer L., Portugal L.A., de Souza C.T., Ferreira S.L.C., „Multisyringe flow injection analysis in spectroanalytical techniques – A review”, *Trends Anal. Chem.*, 2018, **98**, 1–18.
7. Diniz P.H.G.D., de Almeida L.F., Harding D.P., de Araújo M.C.U., „Flow-batch analysis”, *Trends Anal. Chem*., 2012, **35**, 39–49.
8. Iñón F.A., Tudino M.B., „Chapter I. Methodologies and Instrumentation” w: *Advances in Flow Analysis*, WILEY-VCH, Weinheim 2008, s. 2–42.
9. Paluch J., Kozak J., „Wybrane rozwiązania instrumentalne w technikach analizy przepływowej”, *Technical Issues*, 2016, **2**, 45–52.
10. Lapa R.A.S., Lima J.L.F.C., Reis B.F., Santos J.L.M., Zagatto E.A.G., „Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities”, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **466**, 125–132.
11. Ruzicka J., „Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection”, *Analyst*, 2000, **125**, 1053–1060.
12. Cerda V., Ferrer L., Avivar J., Cerda A., „Chapter 5. Instrumentation: Detectors, Accessories and Interfaces” w: *Flow Analysis. A Practical Guide*, Elsevier B.V.,

Amsterdam 2014, s. 125–162.

13. Lobnik A., Turel M., Korent Urek Š., „Chapter 1. Optical Chemical Sensors: Design and Applications" w: *Advances in Chemical Sensors*, IntechOpen, Londyn 2012, s. 3–28.
14. Manz A., Graber N., Widmer H.M., „Miniaturized total chemical analysis systems: novel concept for chemical sensing", *Sens. Actuators B*, 1990, **1** (1–6), 244–248.
15. Kaneda S., Fujii T., „Part IV. Processing Technology. Integrated Microfluidic Systems" w: *Nano/Micro Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2010, s. 179–194.
16. Iwasaki Y., Seyama M., „MicroTAS for Biosensors", NTT Technical Review, 2015, **13** (1), 1–6.
17. Carvalho A.T., Lima R.R., Silva L.M., Simões E.W., Silva M.L.P., „Three-dimensional microchannels as a simple microreactor", *Sens. Actuators B*, 2009, **137**, 393–402.
18. Bruin G.J.M., „Recent developments in electrokinetically driven analysis on microfabricated devices", *Electrophoresis*, 2020, **21**, 3931–3951.
19. Wang J., Chatrathi M.P., Tian B., Polsky R., „Microfabricated electrophoresis chips for simultaneous bioassays of glucose, uric acid, ascorbic acid, and acetaminophen", *Anal. Chem*., 2000, **72** (11), 2514–2518.
20. Fragoso A., Latta D., Laboria N., van Germar F., Hansen-Hagge T.E., Kemmner W., Gärtner C., Klemm R., Drese K.S., O'Sullivan C.K., „Integrated microfluidic platform for the electrochemical detection of breast cancer markers in patient serum samples", *Lab Chip*, 2011, **11**, 625–631.
21. Mohankumar P., Ajayan J., Mohanraj T., Yasodharan R., „Recent developments in biosensors for healthcare and biomedical applications: A review", *Measurement*, 2021, **167**, 1–28.
22. Brzózka Z., Wróblewski W., „Zastosowania sensorów chemicznych" w: *Sensory chemiczne*, OWPW, Warszawa 1999, s. 133–150.

23. Postek W., Gargulinski P., Scheler O., Kaminski T., Garstecki P., „Microfluidic screening of antibiotic susceptibility at a single-cell level shows the inoculum effect of cefotaxime on *E. coli*", *Lab Chip*, 2018, **18**, 3668–3677.

24. Scope Fluidics – Projekt Bacteromic, http://bacteromic.com/, (data dostępu: 23.02.2021 r.)

25. Tvorynska S., Barek J., Josypčuk B., „Amperometric Biosensor Based on Enzymatic Reactor for Choline Determination in Flow Systems", *Electroanal.*, 2019, **31**, 1901–1912.

26. Namieśnik J., „Rozdział 1. Trendy w analityce i monitoringu środowiskowym" w: *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Gdańsk, 2003, s. 1–32.

27. Green Chemistry - American Chemical Society, https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry.html, (data dostępu 23.02.2021 r.)

28. Cerda V., Ferrer L., Avivar J., Cerda A., „Chapter 7. Environmental Applications" w: *Flow Analysis. A Practical Guide*, Elsevier B.V, Amsterdam 2014, s. 175–245.

29. Bezerra M.A., Santelli R.E., Lemos V.A, dos Santos Alves J.P., Ferreira Braz B., Bastos Santos L., „Strategies to Make Methods Based on Flow Injection Analysis Greener", *Clean – Soil, Air, Water*, 2020, **48** (7–8), 2000007.

30. Continuous Flow Analysis & Discrete Analyzers – Chromatography Online, https://www.chromatographyonline.com/view/continuous-flow-analysis-discrete-analyzers, (data dostępu 23.02.2021 r.)

31. Trojanowicz M., „Rozdział 17. Analiza przepływowa w ochronie środowiska" w: *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Gdańsk 2003, s. 370–395.

32. Haque SK M., Ratemi E.S., „Drug Development and Analysis Review", *Pharm. Chem. J.*, 2017, **50**(12), 837–850.

33. Mishra R.K., Dominguez R.B., Bhand S., Muñoz R., Marty J.L., „A novel automated flow-based biosensor for the determination of organophosphate

pesticides in milk", *Biosens. Bioelectron.*, 2012, **32**(1), 56–61.

34. Światowa Organizacja Zdrowia, *WHO 21st Model List of Essential Medicines*, World Health Organization, Genewa 2019, s. 1–65.

35. Struktura 2D związku o identyfikatorze PubChem: CID 149096 (Lewofloksacyny) – PubChem, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/149096#section=2D-Structure, (data dostępu 23.02.2021 r.)

36. Shao X., Li Y., Liu Y., Song Z., „Rapid determination of levofloxacin in pharmaceuticals and biological fluids using a new chemiluminescence system", *J. Anal. Chem.*, 2011, **66** (1), 102–107.

37. Tzanavaras P.D., „Automated Flow Injection Techniques in Pharmaceutical Analysis: A Useful Tool", *Pharm. Anal. Acta*, 2011, **2** (5), 1000105e.

38. Weigl B.H., Bardell R.L., Cabrera C.R., „Lab-on-a-chip for drug development", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, **55**, 349–377.

9

Perspektywy rozwoju sensorów chemicznych i biosensorów

Zbigniew BRZÓZKA

9.1 Kierunki rozwoju sensorów chemicznych i biosensorów

Rozwój wielu dziedzin jest stymulowany z jednej strony ciekawością naukowców, a z drugiej strony potrzebami cywilizacyjnymi, w głównej mierze potrzebami gospodarki i społeczeństwa. Dobrym przykładem tej tezy jest ewolucja „klasycznych" sensorów chemicznych i biosensorów jako urządzeń, wymuszona nowymi potrzebami między innymi w diagnostyce medycznej i systemach

Point-of-Care, w telemedycynie, w badaniach biologicznych, w monitorowaniu środowiska, w eksploracji kosmosu czy do zastosowań na polu walki.

Przyjmując uznane określenie sensora chemicznego [1] jako urządzenia, które przetwarza informację chemiczną (jakościową lub ilościową) na sygnał użyteczny analitycznie oraz jego budowę obejmującą dwa podstawowe elementy: chemicznie selektywną warstwę receptorową i element przetwornikowy, stosunkowo łatwo zrozumiemy kierunki rozwoju tych urządzeń.

W części receptorowej sensora informacja chemiczna jest przekształcana w formę energii, która może być mierzona przez element przetwornika. Stąd ogromne zainteresowanie nowymi materiałami, których zastosowanie jako warstwy receptorowej pozwoli na opracowanie sensora selektywnie oznaczającego pożądany analit na bardzo niskim poziomie stężenia/zawartości w próbce.

Natomiast głównym zadaniem przetwornika jest konwersja mierzonego parametru na sygnał: elektryczny, optyczny lub akustyczny. Rozwój przetworników w sensorach wykorzystuje opracowania innych dziedzin jak mikroelektronika, fotonika. Część z tych materiałów wykazuje dwufunkcyjność (jednocześnie rolę warstwy receptorowej i przetwornika) co ma olbrzymie znaczenie w miniaturyzacji sensorów.

Najciekawszymi i najbardziej obiecującymi nowymi materiałami jako elementami warstwy receptorowej sensora, są:

- nanomateriały o potencjale katalitycznym enzymów,
- nanomateriały węglowe (nanorurki, węglowe kropki kwantowe, pochodne grafenu),

- aptamery.

Wśród ogromnej liczby publikacji poświęconych nowym materiałom stymulujących nowe trendy w konstrukcji sensorów chemicznych i biosensorów warto zwrócić uwagę na kilka z nich.

Poza wykorzystaniem oksydazy glukozy (GOx) jako enzymu redoks, istnieje kilka enzymów, które są w stanie przenieść elektrony bezpośrednio lub z wykorzystaniem mediatora. W przyrodzie wiele enzymów jest wbudowanych do błony komórkowej, mających w tym celu hydrofobowe podjednostki lub łańcuchy lipidowe. Ich rekonstytucja na elektrodach pozwala zachować ich naturalne właściwości strukturalne i umożliwia optymalizację ich właściwości elektrokatalitycznych i stabilności.

W pracy [2] przedstawiono różne strategie biomimetycznych modyfikacji powierzchni elektrod w celu uwzględnienia enzymów związanych z membraną, w tym powstawania samoorganizujących się monowarstw związków hydrofobowych, dwuwarstwowych lipidów lub osadzania liposomów.

Oprócz biosensorów opartych na „klasycznych" enzymach, w ciągu ostatnich dwóch dekad wiele enzymów zostało połączonych z elektrodami półprzewodnikowymi zawierającymi lekki materiał zbierający światło w celu opracowania fotoelektrochemicznych urządzeń sensorowych. Nowym trendem jest integracja nanomateriałów, takich jak kropki kwantowe i nanocząsteczki ditlenku tytanu (TiO_2) z enzymami redoks (np. acetylocholinoesterazy (AChE), oksydazy glukozy (GOx), itp.), w celu zwiększenia czułości urządzenia [3]. Biorąc pod uwagę pomyślne wyniki w tej konkretnej dziedzinie, przyszłe tendencje badawcze z pewnością będą obejmować badanie różnych kombinacji

materiałów półprzewodnikowych i biocząsteczek, a także rozważą możliwość dostrojenia długości fali w celu opracowania wieloanalitycznego fotoelektrochemicznego biosensora.

Ciekawym kierunkiem badań jest rozwój elektrod modyfikowanych nanomateriałem. W kolejnej z prac [4] przedstawiono modyfikacje powierzchni elektrod za pomocą odczynników przeciwdziałających tworzeniu się biofilmu, które ostatecznie zapobiegną niespecyficznej adsorpcji gatunków biologicznych na powierzchni elektrody. Jest to ważny problem, zwłaszcza biorąc pod uwagę badania nad urządzeniami multipleksowanymi i urządzeniami *Point-of-Care* jako opłacalnymi i selektywnymi metodami wykrywania wielu analitów. Wśród wszystkich strategii dostępnych obecnie do opracowania tego typu powierzchni, modyfikacja podłoży elektrod z różnymi biomateriałami, w tym monowarstwami, przejściowymi powłokami polimerowymi lub wielofunkcyjnymi peptydami, jest szczególnie atrakcyjna i obiecująca.

Trwają intensywne badania nad wykorzystaniem materiałów strukturalnych, takich jak nanoporowate metale, grafen i jego pochodne, nanorurki węglowe i mezoporowaty węgiel, do zastosowań w rozwiązaniach biozgodnych [5]. W ostatnim czasie nanomateriały zawierające siarkę i ich pochodne/kompozyty zostały szeroko wykorzystane do opracowania alternatywnych biosensorów. Między innymi w pracy [6] podsumowano ostatnie odkrycia i przyszłe wyzwania związane z zastosowaniem elektrod zmodyfikowanych nanomateriałami siarczku metali, ujawniając w szczególności ich specyficzne właściwości, a mianowicie skalę nanometryczną, dyspersję wody, dużą powierzchnię właściwą,

doskonałą aktywność katalityczną, przewodność, bezpieczeństwo biologiczne, zdolności hartowania fotoluminescencji, fotoaktywność i fascynujące właściwości optyczne.

Duże zainteresowanie wzbudza nowa grupa nanomateriałów o strukturze 2D kryształu (*MXenes*), mających właściwości pośrednie między metalami a materiałami ceramicznym i zapewniających unikalne możliwości do zastosowań bioanalitycznych [7]. Należą do nich wysoka przewodność metaliczna, duża powierzchnia właściwa, hydrofilowość, wysokie właściwości transportowe jonów, biokompatybilność i łatwość funkcjonalizacji powierzchni.

Niezwykle ciekawym obszarem badań są prace dotyczące różnych metod wzmacniania sygnału. Między innymi w pracy Smith i in. [8] dokonano przeglądu ostatnich odkryć i przyszłych wyzwań związanych z wykrywaniem DNA na podstawie testu endonukleazy (REase). Badanie to pozwala na wykrycie na poziomie attomolowym^{2} za pomocą wykładniczej metody wzmocnienia sygnału opartej na kaskadzie samonapędzających się reakcji endonukleazy ograniczającej, które wywołują ciągłe rozszczepienie sond wzmacniających, co prowadzi do wykładniczego wzmocnienia sygnału. Proponowane podejście zapewnia mniej kosztowną, mniej czasochłonną alternatywną metodę wykrywania DNA.

Oprócz wykrywania DNA lub antygenów, immunosensory, DNA/RNA biosensory oraz aptasensory są obecnie uważane w mikrobiologii za potężne narzędzia do wykrywania bakterii na poziomie pojedynczych komórek. Te biosensory umożliwiają specyficzne wykrywanie bakterii w złożonych macierzy biologicznych, często w obecności nadmiernych ilości innych gatunków bakterii [9].

9.2
Rozwój komercjalizacji sensorów chemicznych i biosensorów

Zastosowanie sensorów w analizie składu chemicznego różnych próbek wpływa na poziom zainteresowania tymi urządzeniami, tym bardziej ze względu na rosnące poziomy zanieczyszczeń środowiska i oczekuje się, że tani oraz przenośny charakter sensorów chemicznych będzie napędzał rozwój rynku. Oprócz ochrony środowiska kluczowym segmentem jest również zastosowanie sensorów chemicznych w monitorowaniu i kontroli jakości w chemicznym procesie przemysłowym W 2019 roku rynek sensorów chemicznych został wyceniony na 21,39 mld USD i oczekuje się, że osiągnie wartość 32,96 mld USD do 2025 r., przy rocznym tempie wzrostu wynoszącym 7,51% w okresie objętym prognozą (2020–2025) [10].

Głównym rynkiem sensorów chemicznych ze względu na rosnące zapotrzebowanie na szybkie, kompaktowe, dokładne i przenośne systemy diagnostyczne jest sektor opieki zdrowotnej i biomedycyny. Co więcej, nanotechnologia radykalnie zmieniła charakterystykę działania sensorów chemicznych i zyskuje na znaczeniu na rynku, a jednym z kierunków jest wykorzystanie nanosensorów chemicznych w diagnostyce punktowej.

Wśród 7,6 miliardów mieszkańców świata populacja w wieku ponad 65 lat stanowiła 962,3 miliona. Ze względu na starzenie się populacji i ich podatność na choroby, oczekuje się, że coraz większy wskaźnik występowania chorób drastycznie wzrośnie. Stwarza to

zapotrzebowanie na sensory chemiczne, wykorzystywane m.in. w kilku zastosowaniach klinicznych, takich jak pomiary stężenia glukozy we krwi lub fizjologicznych gazów (tlenu i ditlenku węgla) we krwi) [10].

Rosnące zapotrzebowanie na nową generację sensorów do diagnostyki klinicznej, pomiaru i monitorowania do zastosowań w urządzeniach do implantacji i tzw. ubieralnych stworzyło możliwości o wykładniczym potencjale wzrostu. Niższe koszty surowców i pojawienie się technik nano- i mikroprodukcji w procesie produkcji przemysłowej doprowadziły do znacznego wzrostu komercjalizacji sensorów chemicznych do zastosowań w opiece zdrowotnej.

Noszone (ubieralne) sensory elektrochemiczne zdolne do nieinwazyjnego monitorowania markerów chemicznych stanowią szybko rozwijającą się technologię cyfrowo-medyczną [11]. Ostatnie postępy w kierunku systemów ciągłego monitorowania glukozy (CGM) spowodowały ogromne zainteresowanie rozszerzeniem takiej technologii sensorów na inne ważne dziedziny.

Jedną z nich są urządzenia do noszenia z wbudowanymi miniaturowymi sensorami elektrochemicznymi do inteligentnego dozowania i monitorowania leków. Ciągłe, nieinwazyjne monitorowanie leków terapeutycznych w obrębie płynów ustrojowych umożliwia lekarzom i pacjentom skorelowanie właściwości farmakokinetycznych z optymalnymi wynikami poprzez realizację specyficznej dla pacjenta regulacji dawki i śledzenie dynamicznych zmian w zachowaniu farmakokinetyki przy jednoczesnym zapewnieniu przestrzegania leków u pacjentów.

Analizując trendy rozwojowe i oczekiwania cywilizacyjne, można postawić tezę, że kierunki rozwoju sensorów skupią przede wszystkim na ich miniaturyzacji i autonomiczności, co wynika z prognoz zastosowań sensorów, które jednoznacznie wskazują na dynamiczny rozwój w wybranych cywilnych obszarach takich jak:

- Medycyna (między innymi diagnostyka medyczna, teranostyka, systemy *Point-of-Care*, telemedycyna, autonomiczne mikroroboty wyposażone w nanosensory do monitorowania wnętrza naczyń krwionośnych i organów);
- Inteligentne systemy ubieralne (*wearable systems*), tj. mobilne urządzenia elektroniczne obejmujące autonomiczne sensory, które mogą być dyskretnie osadzone w stroju użytkownika jako część odzieży lub akcesorium;
- Internet rzeczy (*Internet of Things*) jako koncepcja urządzeń (bezobsługowe sensory, autonomiczne systemy sensorowe) mogących połączyć się z internetem lub innymi urządzeniami, korzystając bezpośrednio z sieci bezprzewodowych

Znaczny potencjał badawczy, wsparty ogromnymi nakładami finansowymi w obszarze sensorów chemicznych i biosensorów jest zaangażowany w obszarach: wojskowym i eksploracji kosmosu (m.in. wyposażenie żołnierzy na polu walki, systemy monitorowania chemicznego, wyposażenie stacji kosmicznych). Warto podkreślić, że ogromna część rozwiązań opracowana na potrzeby wojska i eksploracji kosmosu z pewnym opóźnieniem zostaje wykorzystana w sferze cywilnej (m.in. *wearable systems*, systemy *Point-of-Care*, autonomiczne systemy).

9.3
Przyszłość wykorzystania sensorów chemicznych i biosensorów w diagnostyce medycznej

Spróbujmy określić więc przyszłość sensorów i biosensorów w jednym z najważniejszych cywilnych obszarów zastosowań, tj. w medycynie. **Jaka jest przyszłość wykorzystania sensorów chemicznych i biosensorów w diagnostyce medycznej, do wykonywania testów i badań w domu?** Wiele raportów i opracowań wskazuje na kilka zasadniczych elementów [10, 12].

Wydaje się nieuniknione, że za 15 lat pacjent nie będzie musiał będzie iść do lekarza, aby zostać zdiagnozowanym. Rozwój technologii, miniaturyzacja i redukcja kosztów w ciągu ostatnich 20 lat umożliwiły częste lub nawet ciągłe dokonywanie niektórych pomiarów. Na przykład, teraz możliwe jest dołączenie czujników do pacjenta, aby stale mierzyć ciśnienie krwi, szybkość oddychania, bicie serca i natlenienie krwi. W ciągu ostatnich pięciu lat coraz częściej możliwe było przetwarzanie, rejestrowanie i przesyłanie tych pomiarów do chmury za pośrednictwem smartfonów. Jednak, istnieje ograniczenie do tego, co można zdiagnozować po prostu za pomocą pomiarów fizycznych, takich jak tętno, ciśnienie krwi i natlenienie krwi. Podczas gdy smartfon podłączony do chmury może wykonać wiele działań przetwarzania i analizy sygnału, nadal

pozostaje podstawowy limit tego, co można wykryć za pomocą sensorów nieinwazyjnych.

Niektóre testy zawsze będą wymagały dostępu do próbki krwi, np. do wykonania pełnej morfologii lub parametrów biochemicznych krwi. Olbrzymie środki zainwestowano w próby opracowania nieinwazyjnych pomiarów biochemicznych, ale niestety jest to niezwykle trudne do osiągnięcia. Wyjątkiem jest pulsoksymetria, ponieważ hemoglobina, która jest istotnym elementem morfotycznym krwi, odgrywającym m.in. rolę barwnika krwi, ulega dużej zmianie zabarwienia po utlenieniu. Niestety większość innych analitów, takich jak glukoza, jest znacznie mniej podatna na monitorowanie nieinwazyjne. Miliardy dolarów zostały wydane na opracowanie nieinwazyjnego pomiaru glukozy we krwi w ciągu ostatnich 25 lat, ale nawet najnowsze sensory glukozy we krwi nadal muszą być umieszczone pod skórą.

Jednym z największych problemów z wykorzystaniem implantowanego sensora jest to, że materiał sensora powoduje krzepnięcie krwi, zostaje zaatakowany przez układ odpornościowy i ostatecznie sensor jest opłaszczany przez organizm, tracąc swoje zdolności pomiarowe. Stosuje się zaawansowane materiały na powłoki sensora, które spowalniają te procesy, ale ostatecznie po pewnym czasie urządzenie jest opłaszczane.

Innym dużym problemem z implantowanymi biosensorami jest to, że większość biosensorów wykorzystuje cząsteczki biologiczne do rozpoznawania i wiązania się z analitem. Cząsteczki biologiczne, takie jak przeciwciała lub białka, są wrażliwe na warunki środowiska. Na przykład przeciwciała dołączone do paska testowego ciążowego są stabilne przez dwa lata w suchym opakowaniu, ale nie pozostaną

trwałe dłużej niż kilka godzin wewnątrz ciała. Oznacza to, że zdecydowana większość biosensorów biologicznych i biochemicznych nie może być wszczepiona do organizmu.

Można oczekiwać postępów w wykrywaniu nowych analitów/markerów, w wykorzystaniu rozwiązań mikrofluidycznych (mikroprzepływy), przetwarzaniu sygnału i technologii MEMS, które mają największy wpływ na badania w laboratoriach centralnych, a nie w domu lub gabinecie lekarskim. Centralne laboratoria są miejscem, gdzie obecnie wykonuje się zdecydowaną większość klinicznych testów diagnostycznych, a te instytucje mogą sobie pozwolić na duże zautomatyzowane systemy, negocjować znaczne rabaty ilościowe na odczynniki, mieć procedury QC/QA i są już zintegrowane ze szpitalnymi systemami informacyjnymi.

Nowe technologie mogą znacznie obniżyć koszty poprzez miniaturyzację i multipleksowanie, wówczas możliwe będzie regularne testowanie ogólnej populacji dla całego panelu biomarkerów, wcześniejsze wykrywanie chorób i umożliwianie działań zapobiegawczych.

Jest to na ogół zbyt drogie w chwili obecnej, ale w miarę spadku kosztów diagnostyki i wzrostu kosztów leczenia (leki, interwencja chirurgiczna, opieka długoterminowa i tak dalej), możemy osiągnąć punkt zwrotny, gdy rutynowe badania przesiewowe staną się ekonomicznie opłacalne. Na przykład, każdy w wieku powyżej 40 lat może oddać próbkę krwi co miesiąc i wysłać ją do centralnego laboratorium, które zrobi analizę biochemiczną, porówna dane z poprzednimi odczytami i zgłosi wszelkie obawy bezpośrednio do lekarza podstawowej opieki zdrowotnej.

Ekscytującą konsekwencją tej zmiany jest zwiększona możliwość wykrycia tych nowotworów, które są niewykrywalne za pomocą jednorazowego testu, ale które czasami mogą być zauważone w wyniku monitorowania panelu biomarkerów przez dłuższy okres.

Obecnie testy te są zbyt drogie i nie mają szczególnie wysokiej czułości i specyficzności, ale zbierane dla danego pacjenta w miesięcznym badaniu i analizowane przez specjalistyczne oprogramowanie, pozwolą wykryć nowotwory i inne poważne choroby na wczesnym etapie, ratując życie pacjentom.

Przyszłość diagnostyki i monitorowania jest fascynująca. Wyzwania są wyższe dla dzisiejszych innowatorów niż dla ich poprzedników, ale dziś mamy do dyspozycji bezprecedensowy zestaw nowych technologii. Warto podkreślić, że osobami fizycznymi i firmami, które najbardziej poprawią opiekę nad pacjentami, będą ci, którzy rozumieją swoich użytkowników i którzy mogą wykorzystać nowe technologie do tworzenia produktów, które oferują widoczne i wymierne korzyści ekonomiczne.

Literatura

1. Hulanicki A., Głąb S., Ingman F., "Chemical sensors definitions and classification", *Pure Appl. Chem.*, 1991, **63**, 1247–1250.
2. Alvarez-Malmagro J., García-Molina G., López De Lacey A., "Electrochemical Biosensors Based on Membrane-Bound Enzymes in Biomimetic Configurations", *Sensors*, 2020, **20**, 3393.
3. Del Barrio M., Luna-López G., Pita M., "Enhancement of Biosensors by Implementing Photoelectrochemical Processes", *Sensors*, 2020, **20**, 3281.

4. Campuzano S., Pedrero M., Gamella M., Serafín V., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J.M., "Beyond sensitive and selective electrochemical biosensors: Towards continuous, real-time, antibiofouling and calibration-free devices", *Sensors*, 2020, **20**, 3376.

5. Otero F., Magner E., "Biosensors – Recent Advances and Future Challenges in Electrode Materials", *Sensors*, 2020, **20**, 3561.

6. Li C., Wang Y., Jiang H., Wang X., "Biosensors Based on Advanced Sulfur-Containing Nanomaterials", *Sensors*, 2020, **20**, 3488.

7. Khan R., Andreescu S., "MXenes-Based Bioanalytical Sensors: Design, Characterization, and Applications", *Sensors*, 2020, **20**, 5434.

8. Smith M., Smith K., Olstein A., Oleinikov A., Ghindilis A., "Restriction Endonuclease-Based Assays for DNA Detection and Isothermal Exponential Signal Amplification", *Sensors*, 2020, **20**, 3873.

9. Jamal R.B., Shipovskov S., Ferapontova E.E., "Electrochemical Immuno-and Aptamer-Based Assays for Bacteria: Pros and Cons over Traditional Detection Schemes", *Sensors*, 2020, **20**, 5561.

10. Chemical sensor market – growth, trends, and forecast (2020– 2025), https://www.asdreports.com/market-research-report-508112/chemical-sensor-market-growth-trends-forecast (data dostępu 20.01.2021 r.).

11. Teymourian H., Parrilla M., Sempionatto J.R., Montiel N.F., Barfidokht A., Van Echelpoel R., De Wael K., Wang J., „Wearable Electrochemical Sensors for the Monitoring and Screening of Drugs", *ACS Sens.*, 2020, **5** (9), 2679–2700.

12. https://www.team-consulting.com/insights/never-mind-the-biosensors/.(data dostępu 20.01.2021 r.).

10

Appendix. Sensory jako wyroby medyczne – regulacje prawne

Dorota STADNIK, Jacek STADNIK

Czujniki do diagnostyki medycznej w świetle prawa międzynarodowego są wyrobami medycznymi i ich stosowanie jest regulowane odpowiednimi procedurami rejestracyjnymi. W UE wymagania rejestracyjne dla wyrobów medycznych są zawarte w Rozporządzeniach Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 2017/745 oraz 2017/746 [1, 2]. W USA za ustanowienie procesu zatwierdzania i procedury dopuszczania wyrobów medycznych do obrotu odpowiada FDA (Kodeks Przepisów Federalnych – 21 CFR) [3, 4, 5].

10.1
Definicje

„Wyrób medyczny” oznacza narzędzie, aparat, urządzenie, oprogramowanie, implant, odczynnik, materiał lub inny artykuł przewidziany przez producenta do stosowania:

- pojedynczo lub łącznie,
- u ludzi do co najmniej jednego z następujących szczególnych zastosowań medycznych:
  - diagnozowanie, profilaktyka, monitorowanie, przewidywanie, prognozowanie, leczenie lub łagodzenie choroby,
  - diagnozowanie, monitorowanie, leczenie, łagodzenie lub kompensowanie urazu lub niepełnosprawności,
  - badanie, zastępowanie lub modyfikowanie budowy anatomicznej lub procesu lub stanu fizjologicznego lub chorobowego,
  - dostarczanie informacji poprzez badanie in vitro próbek pobranych z organizmu ludzkiego, w tym pobranych od dawców narządów, krwi i tkanek,

i który nie osiąga swojego zasadniczego przewidzianego działania środkami farmakologicznymi, immunologicznymi lub metabolicznymi w ludzkim ciele lub na nim, ale którego działanie może być wspomagane takimi środkami.

„Wyrób aktywny” oznacza wyrób, którego funkcjonowanie zależy od źródła energii innego niż energia generowana przez ciało ludzkie do tego celu lub przez siłę grawitacji i który działa poprzez zmianę gęstości lub przetwarzanie tej energii. Za wyroby aktywne nie uznaje się wyrobów przeznaczonych do przenoszenia między

wyrobem aktywnym a pacjentem – bez istotnych zmian – energii, substancji lub innych elementów. Oprogramowanie również uznaje się za wyrób aktywny.

„Wyrób do implantacji” oznacza wyrób, włącznie z wyrobami częściowo lub całkowicie wchłoniętymi, który jest przeznaczony do:

- całkowitego wprowadzenia do ludzkiego ciała lub
- zastąpienia powierzchni nabłonka lub powierzchni oka, w drodze zabiegu chirurgicznego i który po zabiegu ma pozostać na miejscu.

Za wyrób do implantacji uznaje się również wyrób przeznaczony do częściowego wprowadzenia do ludzkiego ciała w drodze zabiegu chirurgicznego i który po zabiegu ma pozostać na miejscu przez co najmniej 30 dni;

„Wyrób inwazyjny” oznacza wyrób, który w całości lub części wnika do wnętrza ciała przez jeden z jego otworów lub przez powierzchnię ciała.

10.2 Klasyfikacja wyrobów medycznych

W USA i UE podstawą dopuszczenia do obrotu jest podział wyrobów medycznych na klasy ryzyka. Każdy wyrób medyczny jest przypisany do określonej klasy ryzyka w zależności od jego inwazyjności.

W zależności od klasy ryzyka są stosowane różne wymagania i przepisy, a im wyższa klasa ryzyka, tym surowsze wymagania.

W klasyfikacji wyrobów medycznych bierze się pod uwagę następujące czynniki:

- czas, w którym wyrób ma kontakt z pacjentem,
- rodzaj kontaktu z pacjentem,
- stopień inwazyjności,
- tzw. reguły specjalne.

Zarówno w USA, jak i w UE, wyroby medyczne zaliczane do I klasy ryzyka wiążą się z niskim ryzykiem. Wyroby o średnim ryzyku – w klasie II oraz wyroby o wysokim ryzyku – w klasie III. W UE, zgodnie z Dyrektywą nr 2017/745 podział na klasy wygląda następująco:

- klasa I obejmuje wyroby nieinwazyjne stosowane jako bariery mechaniczne (np. do ucisku lub wchłaniania wysięków), a także pozostałe wyroby medyczne nieinwazyjne, niewłączone do pozostałych klas. Klasa I obejmuje także wyroby inwazyjne do użytku chwilowego, narzędzia chirurgiczne wielorazowego użytku oraz niektóre wyroby aktywne do diagnostyki;
- klasa IIa obejmuje wyroby nieinwazyjne, służące do przesyłania i przechowywania krwi i innych płynów ustrojowych, a także te, które służą do wytworzenia mikrośrodowiska dla uszkodzonej skóry. Klasa IIa to także wyroby inwazyjne, jak wyroby chirurgiczne oraz niektóre inne wyroby stosowane przez różne otwory w ciele do krótkotrwałego użytku. Do klasy IIa zalicza się także implanty stomatologiczne, niektóre wyroby terapeutyczne (których działanie jest oparte na podawaniu lub wymianie energii), wyroby monitorujące procesy fizjologiczne lub funkcje

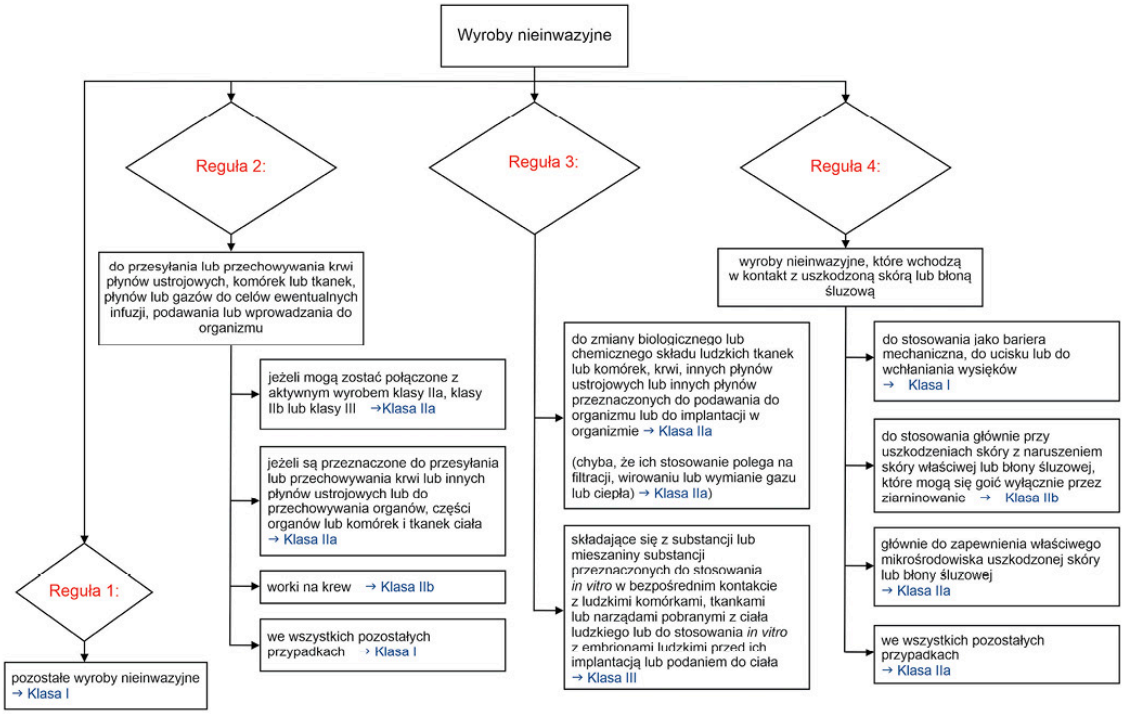
życiowe pacjentów, a także oprogramowanie, które do tego służy. Kategoria IIa obejmuje też wyroby do sterylizacji, czy też rejestracji obrazu RTG, a także wyroby służące do bezpiecznego podawania substancji leczniczych lub ich usuwania z organizmu;

- klasa IIb zawiera np. worki na krew, wyroby chirurgiczne, wywołujące efekt biologiczny w organizmie oraz generujące promieniowanie jonizujące, wyroby wykorzystywane do diagnostyki w warunkach ambulatoryjnych, w stanie bezpośredniego zagrożenia zdrowia lub życia pacjenta. W tej klasie znajdują się także wyroby do podawania substancji w sposób potencjalnie niebezpieczny, wyroby antykoncepcyjne i zapobiegające przenoszeniu chorób drogą płciową, wyroby do czyszczenia, płukania i dezynfekcji;
- w klasie III znajdują się wyroby nieinwazyjne przeznaczone do stosowania w procedurze *in vitro*, urządzenia do kontrolowania, diagnozowania, monitorowania lub korygowania wad serca lub centralnego układu krążenia poprzez bezpośredni kontakt z tymi częściami organizmu, wyroby do implantacji bezpośrednio kontaktujące się z układem krążenia lub nerwowym, implanty, protezy stawowe (z wyjątkiem np. śrub, klinów, płytek).

Schematy klasyfikacji wyrobów medycznych na podstawie reguł klasyfikacyjnych wg zał. VIII Rozporządzenia 2017/745 przedstawiono na rys. 10.1–6 [6].

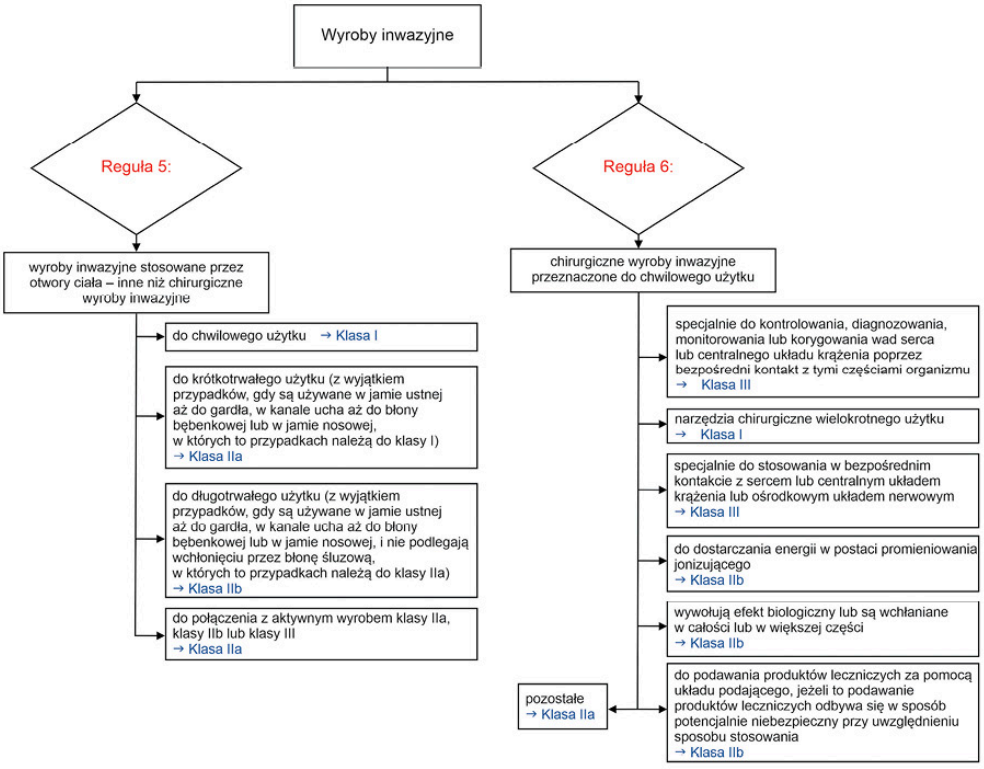
RYS. 10.1

Schemat klasyfikacji wyrobów medycznych dla reguł 1-4


Wyroby nieinwazyjne
Reguła 1:
pozostałe wyroby nieinwazyjne
→ Klasa I
Reguła 2:
do przesyłania lub przechowywania krwi płynów ustrojowych, komórek lub tkanek, płynów lub gazów do celów ewentualnych infuzji, podawania lub wprowadzania do organizmu
jeżeli mogą zostać połączone z aktywnym wyrobem klasy IIa, klasy IIb lub klasy III →Klasa IIa
jeżeli są przeznaczone do przesyłania lub przechowywania krwi lub innych płynów ustrojowych lub do przechowywania organów, części organów lub komórek i tkanek ciała
→ Klasa IIa
worki na krew → Klasa IIb
we wszystkich pozostałych przypadkach › Klasa I
Reguła 3:
do zmiany biologicznego lub chemicznego składu ludzkich tkanek lub komórek, krwi, innych płynów ustrojowych lub innych płynów przeznaczonych do podawania do organizmu lub do implantacji w organizmie → Klasa IIa
(chyba, że ich stosowanie polega na filtracji, wirowaniu lub wymianie gazu lub ciepła) → Klasa IIa)
składające się z substancji lub mieszaniny substancji przeznaczonych do stosowania
in vitro w bezpośrednim kontakcie z ludzkimi komórkami, tkankami lub narządami pobranymi z ciała ludzkiego lub do stosowania in vitro z embrionami ludzkimi przed ich implantacją lub podaniem do ciała
→ Klasa III
Reguła 4:
wyroby nieinwazyjne, które wchodzą w kontakt z uszkodzoną skórą lub błoną śluzową
do stosowania jako bariera mechaniczna, do ucisku lub do wchłaniania wysięków
→ Klasa I
do stosowania głównie przy uszkodzeniach skóry z naruszeniem skóry właściwej lub błony śluzowej, które mogą się goić wyłącznie przez ziarninowanie → Klasa IIb
głównie do zapewnienia właściwego mikrośrodowiska uszkodzonej skóry lub błony śluzowej
→ Klasa IIa
we wszystkich pozostałych przypadkach
→ Klasa IIa

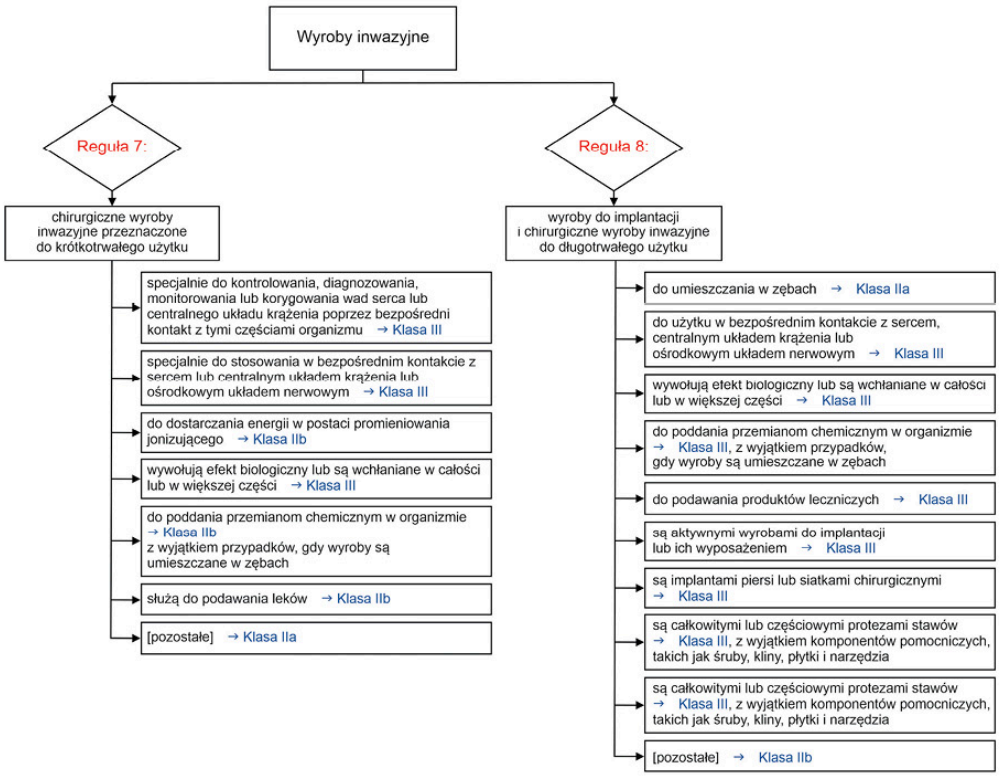
RYS. 10.2

Schemat klasyfikacji wyrobów medycznych dla reguł 5–6


Wyroby inwazyjne
Reguła 5:
wyroby inwazyjne stosowane przez otwory ciała – inne niż chirurgiczne wyroby inwazyjne
do chwilowego użytku → Klasa I
do krótkotrwałego użytku (z wyjątkiem przypadków, gdy są używane w jamie ustnej aż do gardła, w kanale ucha aż do błony bębenkowej lub w jamie nosowej, w których to przypadkach należą do klasy I)
→ Klasa IIa
do długotrwałego użytku (z wyjątkiem przypadków, gdy są używane w jamie ustnej aż do gardła, w kanale ucha aż do błony bębenkowej lub w jamie nosowej, i nie podlegają wchłonięciu przez błonę śluzową, w których to przypadkach należą do klasy IIa)
→ Klasa IIb
do połączenia z aktywnym wyrobem klasy IIa, klasy IIb lub klasy III
→ Klasa IIa
Reguła 6:
chirurgiczne wyroby inwazyjne przeznaczone do chwilowego użytku
specjalnie do kontrolowania, diagnozowania, monitorowania lub korygowania wad serca lub centralnego układu krążenia poprzez bezpośredni kontakt z tymi częściami organizmu
→ Klasa III
narzędzia chirurgiczne wielokrotnego użytku
→ Klasa I
specjalnie do stosowania w bezpośrednim kontakcie z sercem lub centralnym układem krążenia lub ośrodkowym układem nerwowym
→ Klasa III
do dostarczania energii w postaci promieniowania jonizującego
→ Klasa IIb
wywołują efekt biologiczny lub są wchłaniane w całości lub w większej części
→ Klasa IIb
do podawania produktów leczniczych za pomocą układu podającego, jeżeli to podawanie produktów leczniczych odbywa się w sposób potencjalnie niebezpieczny przy uwzględnieniu sposobu stosowania
→ Klasa IIb
pozostałe
→ Klasa IIa

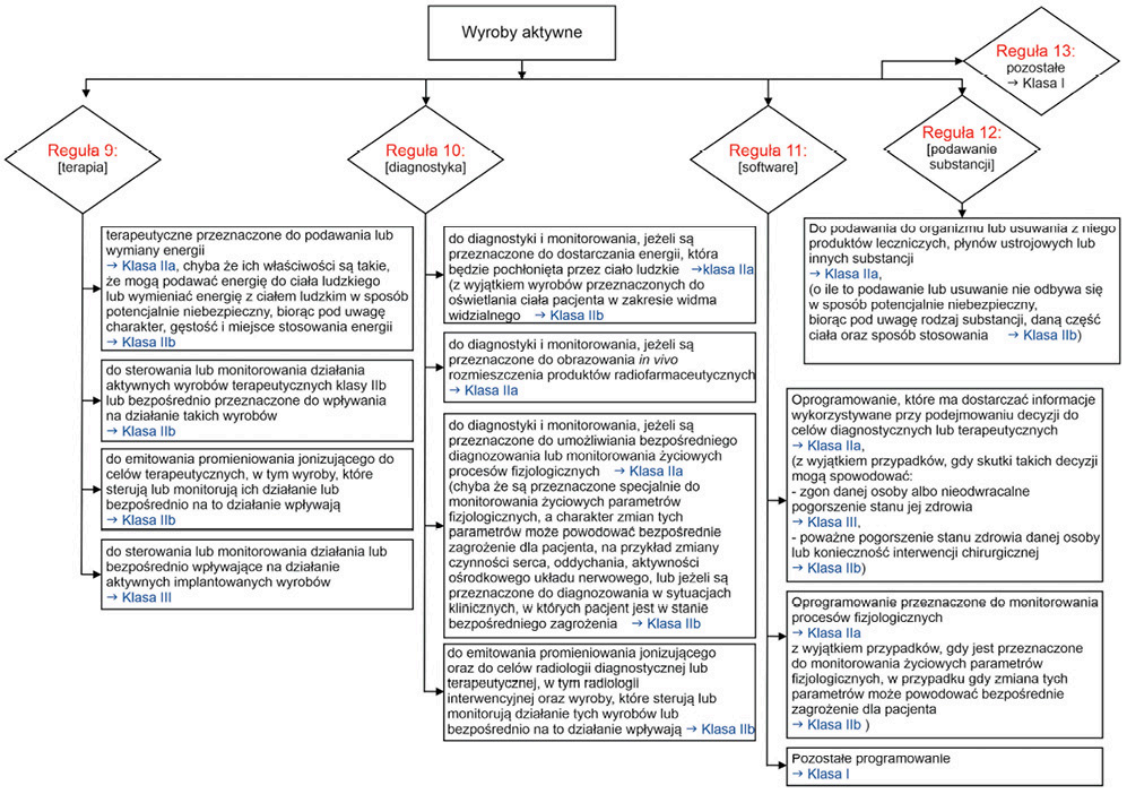
RYS. 10.3

Schemat klasyfikacji wyrobów medycznych dla reguł 7–8


Wyroby inwazyjne
Reguła 7:
Reguła 8:
chirurgiczne wyroby inwazyjne przeznaczone do krótkotrwałego użytku
wyroby do implantacji i chirurgiczne wyroby inwazyjne do długotrwałego użytku
specjalnie do kontrolowania, diagnozowania, monitorowania lub korygowania wad serca lub centralnego układu krążenia poprzez bezpośredni kontakt z tymi częściami organizmu → Klasa III
specjalnie do stosowania w bezpośrednim kontakcie z sercem lub centralnym układem krążenia lub ośrodkowym układem nerwowym → Klasa III
do dostarczania energii w postaci promieniowania jonizującego → Klasa IIb
wywołują efekt biologiczny lub są wchłaniane w całości lub w większej części → Klasa III
do poddania przemianom chemicznym w organizmie → Klasa IIb z wyjątkiem przypadków, gdy wyroby są umieszczane w zębach
służą do podawania leków → Klasa IIb
[pozostałe] → Klasa IIa
do umieszczania w zębach → Klasa IIa
do użytku w bezpośrednim kontakcie z sercem, centralnym układem krążenia lub ośrodkowym układem nerwowym → Klasa III
wywołują efekt biologiczny lub są wchłaniane w całości lub w większej części → Klasa III
do poddania przemianom chemicznym w organizmie → Klasa III, z wyjątkiem przypadków, gdy wyroby są umieszczane w zębach
do podawania produktów leczniczych → Klasa III
są aktywnymi wyrobami do implantacji lub ich wyposażeniem → Klasa III
są implantami piersi lub siatkami chirurgicznymi → Klasa III
są całkowitymi lub częściowymi protezami stawów → Klasa III, z wyjątkiem komponentów pomocniczych, takich jak śruby, kliny, płytki i narzędzia
są całkowitymi lub częściowymi protezami stawów → Klasa III, z wyjątkiem komponentów pomocniczych, takich jak śruby, kliny, płytki i narzędzia
[pozostałe] → Klasa IIb

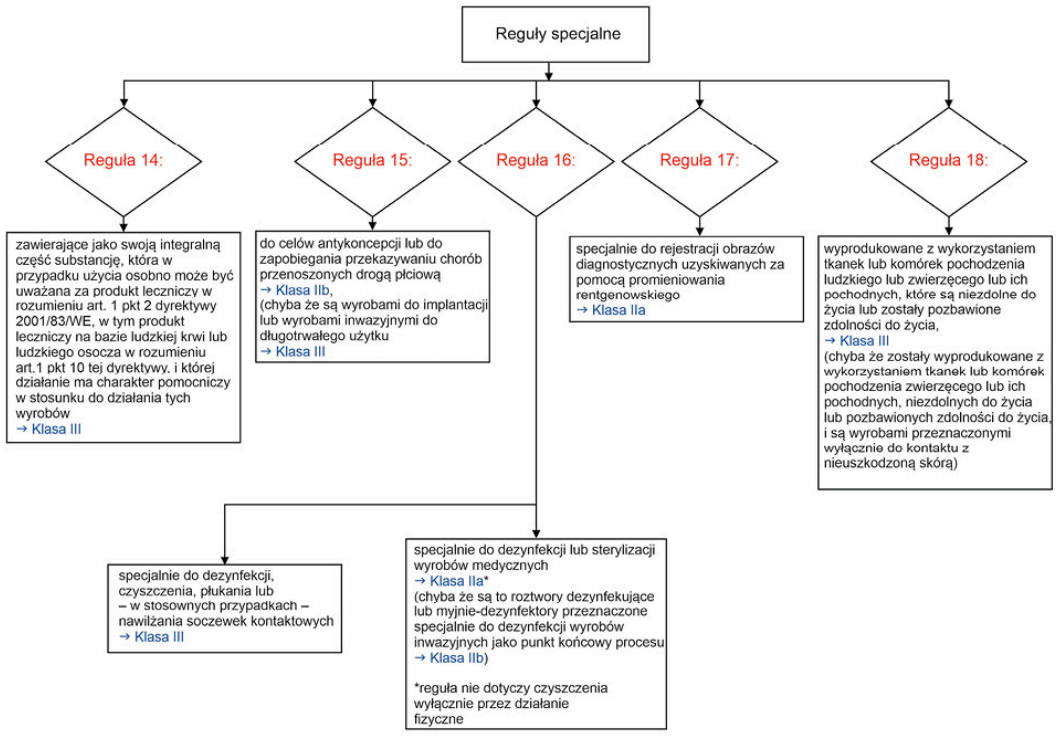
RYS. 10.4

Schemat klasyfikacji wyrobów medycznych dla reguł 9–13


Wyroby aktywne
Reguła 9:
[terapia]
Reguła 10:
[diagnostyka]
Reguła 11:
[software]
Reguła 12:
[podawanie substancji]
Reguła 13:
pozostałe
→ Klasa I
terapeutyczne przeznaczone do podawania lub wymiany energii
→ Klasa IIa, chyba że ich właściwości są takie, że mogą podawać energię do ciała ludzkiego lub wymieniać energię z ciałem ludzkim w sposób potencjalnie niebezpieczny, biorąc pod uwagę charakter, gęstość i miejsce stosowania energii
→ Klasa IIb
do sterowania lub monitorowania działania aktywnych wyrobów terapeutycznych klasy IIb lub bezpośrednio przeznaczone do wpływania na działanie takich wyrobów
→ Klasa IIb
do emitowania promieniowania jonizującego do celów terapeutycznych, w tym wyroby, które sterują lub monitorują ich działanie lub bezpośrednio na to działanie wpływają
→ Klasa IIb
do sterowania lub monitorowania działania lub bezpośrednio wpływające na działanie aktywnych implantowanych wyrobów
→ Klasa III
do diagnostyki i monitorowania, jeżeli są przeznaczone do dostarczania energii, która będzie pochłonięta przez ciało ludzkie →klasa IIa
(z wyjątkiem wyrobów przeznaczonych do oświetlania ciała pacjenta w zakresie widma widzialnego → Klasa IIb
do diagnostyki i monitorowania, jeżeli są przeznaczone do obrazowania *in vivo* rozmieszczenia produktów radiofarmaceutycznych
→ Klasa IIa
do diagnostyki i monitorowania, jeżeli są przeznaczone do umożliwiania bezpośredniego diagnozowania lub monitorowania życiowych procesów fizjologicznych → Klasa IIa
(chyba że są przeznaczone specjalnie do monitorowania życiowych parametrów fizjologicznych, a charakter zmian tych parametrów może powodować bezpośrednie zagrożenie dla pacjenta, na przykład zmiany czynności serca, oddychania, aktywności ośrodkowego układu nerwowego, lub jeżeli są przeznaczone do diagnozowania w sytuacjach klinicznych, w których pacjent jest w stanie bezpośredniego zagrożenia → Klasa IIb
do emitowania promieniowania jonizującego oraz do celów radiologii diagnostycznej lub terapeutycznej, w tym radiologii interwencyjnej oraz wyroby, które sterują lub monitorują działanie tych wyrobów lub bezpośrednio na to działanie wpływają → Klasa IIb
Do podawania do organizmu lub usuwania z niego produktów leczniczych, płynów ustrojowych lub innych substancji
→ Klasa IIa,
(o ile to podawanie lub usuwanie nie odbywa się w sposób potencjalnie niebezpieczny, biorąc pod uwagę rodzaj substancji, daną część ciała oraz sposób stosowania → Klasa IIb)
Oprogramowanie, które ma dostarczać informacje wykorzystywane przy podejmowaniu decyzji do celów diagnostycznych lub terapeutycznych
→ Klasa IIa,
(z wyjątkiem przypadków, gdy skutki takich decyzji mogą spowodować:
- zgon danej osoby albo nieodwracalne pogorszenie stanu jej zdrowia
→ Klasa III,
- poważne pogorszenie stanu zdrowia danej osoby lub konieczność interwencji chirurgicznej
→ Klasa IIb)
Oprogramowanie przeznaczone do monitorowania procesów fizjologicznych
→ Klasa IIa
z wyjątkiem przypadków, gdy jest przeznaczone do monitorowania życiowych parametrów fizjologicznych, w przypadku gdy zmiana tych parametrów może powodować bezpośrednie zagrożenie dla pacjenta
→ Klasa IIb)
Pozostałe programowanie
→ Klasa I

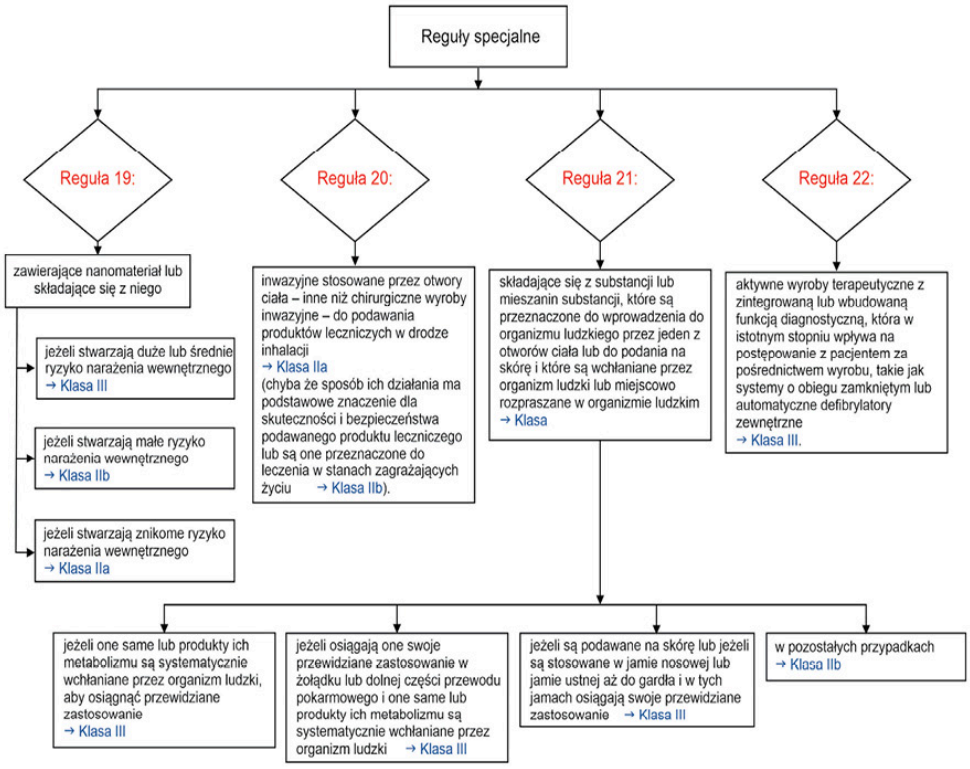
RYS. 10.5

Schemat klasyfikacji wyrobów medycznych dla reguł 14–18


Reguły specjalne
Reguła 14:
zawierające jako swoją integralną część substancję, która w przypadku użycia osobno może być uważana za produkt leczniczy w rozumieniu art. 1 pkt 2 dyrektywy 2001/83/WE, w tym produkt leczniczy na bazie ludzkiej krwi lub ludzkiego osocza w rozumieniu art.1 pkt 10 tej dyrektywy, i której działanie ma charakter pomocniczy w stosunku do działania tych wyrobów
→ Klasa III
Reguła 15:
do celów antykoncepcji lub do zapobiegania przekazywaniu chorób przenoszonych drogą płciową
→ Klasa IIb,
(chyba że są wyrobami do implantacji lub wyrobami inwazyjnymi do długotrwałego użytku
→ Klasa III
Reguła 16:
specjalnie do dezynfekcji, czyszczenia, płukania lub
– w stosownych przypadkach – nawilżania soczewek kontaktowych
→ Klasa III
specjalnie do dezynfekcji lub sterylizacji wyrobów medycznych
→ Klasa IIa*
(chyba że są to roztwory dezynfekujące lub myjnie-dezynfektory przeznaczone specjalnie do dezynfekcji wyrobów inwazyjnych jako punkt końcowy procesu
→ Klasa IIb)
*reguła nie dotyczy czyszczenia wyłącznie przez działanie fizyczne
Reguła 17:
specjalnie do rejestracji obrazów diagnostycznych uzyskiwanych za pomocą promieniowania rentgenowskiego
→ Klasa IIa
Reguła 18:
wyprodukowane z wykorzystaniem tkanek lub komórek pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego lub ich pochodnych, które są niezdolne do życia lub zostały pozbawione zdolności do życia,
→ Klasa III
(chyba że zostały wyprodukowane z wykorzystaniem tkanek lub komórek pochodzenia zwierzęcego lub ich pochodnych, niezdolnych do życia lub pozbawionych zdolności do życia, i są wyrobami przeznaczonymi wyłącznie do kontaktu z nieuszkodzoną skórą)

RYS. 10.6

Schemat klasyfikacji wyrobów medycznych dla reguł 19–22


Reguły specjalne
Reguła 19:
Reguła 20:
Reguła 21:
Reguła 22:
zawierające nanomateriał lub składające się z niego
jeżeli stwarzają duże lub średnie ryzyko narażenia wewnętrznego → Klasa III
jeżeli stwarzają małe ryzyko narażenia wewnętrznego → Klasa IIb
jeżeli stwarzają znikome ryzyko narażenia wewnętrznego → Klasa IIa
inwazyjne stosowane przez otwory ciała – inne niż chirurgiczne wyroby inwazyjne – do podawania produktów leczniczych w drodze inhalacji → Klasa IIa (chyba że sposób ich działania ma podstawowe znaczenie dla skuteczności i bezpieczeństwa podawanego produktu leczniczego lub są one przeznaczone do leczenia w stanach zagrażających życiu → Klasa IIb).
składające się z substancji lub mieszanin substancji, które są przeznaczone do wprowadzenia do organizmu ludzkiego przez jeden z otworów ciała lub do podania na skórę i które są wchłaniane przez organizm ludzki lub miejscowo rozpraszane w organizmie ludzkim → Klasa
aktywne wyroby terapeutyczne z zintegrowaną lub wbudowaną funkcją diagnostyczną, która w istotnym stopniu wpływa na postępowanie z pacjentem za pośrednictwem wyrobu, takie jak systemy o obiegu zamkniętym lub automatyczne defibrylatory zewnętrzne → Klasa III.
jeżeli one same lub produkty ich metabolizmu są systematycznie wchłaniane przez organizm ludzki, aby osiągnąć przewidziane zastosowanie → Klasa III
jeżeli osiągają one swoje przewidziane zastosowanie w żołądku lub dolnej części przewodu pokarmowego i one same lub produkty ich metabolizmu są systematycznie wchłaniane przez organizm ludzki → Klasa III
jeżeli są podawane na skórę lub jeżeli są stosowane w jamie nosowej lub jamie ustnej aż do gardła i w tych jamach osiągają swoje przewidziane zastosowanie → Klasa III
w pozostałych przypadkach → Klasa IIb

10.3
Rejestracja wyrobów medycznych

Organy rządowe w różnych krajach mają własne przepisy regulujące wprowadzanie wyrobów medycznych na rynek oraz nadzorowanie i monitorowanie wyrobów będących już w sprzedaży i użyciu. Proces rejestracji wyrobu medycznego w UE składa się z 4 etapów (rys. 10.7). Na początku producent musi zdefiniować zamierzone wykorzystanie (wskazania) jego produktu w celu przeprowadzenia klasyfikacji ryzyka. Następnie muszą zostać przedstawione zasadnicze wymagania procesu produkcji wyrobu medycznego. W przypadku wyrobów do implantacji i wyrobów klasy III może

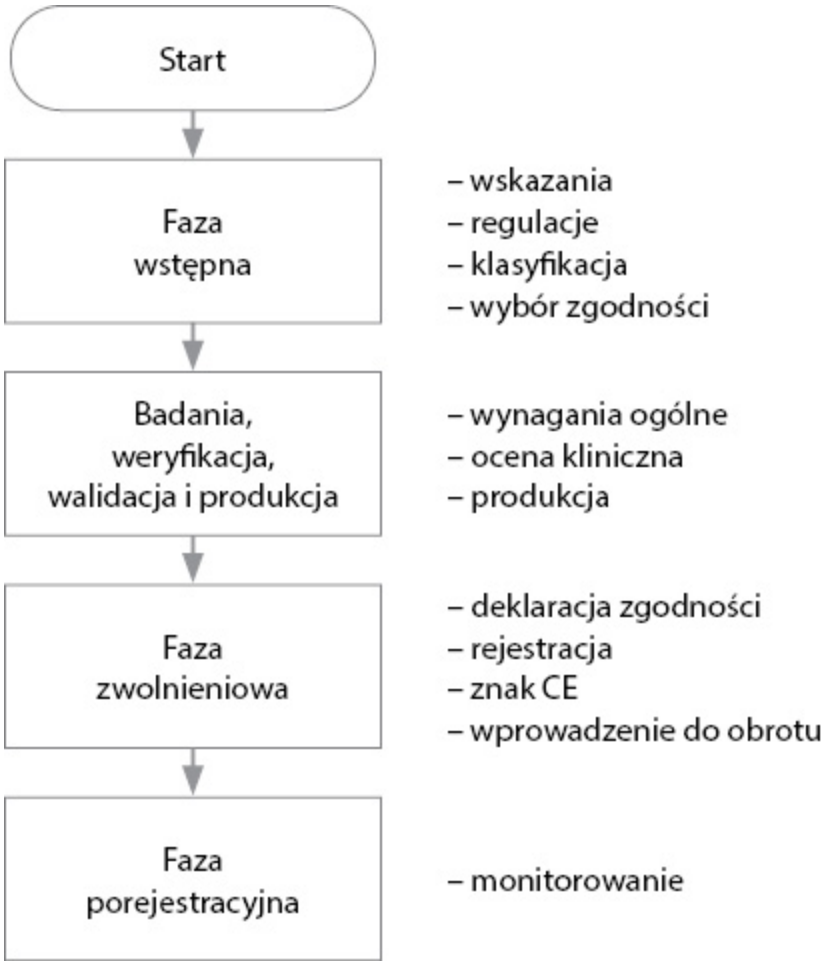
istnieć konieczność przeprowadzenia badań klinicznych, ponieważ są one podstawą potwierdzenia bezpieczeństwa i działania wyrobu oraz oceny działań niepożądanych i akceptowalności stosunku korzyści do ryzyka.

W celu rejestracji wyrobu medycznego konieczna jest współpraca z Jednostką Notyfikowaną. Jednostka Notyfikowana jest odpowiedzialna za przeprowadzenie procedury oceny zgodności weryfikującej właściwości wyrobu medycznego, procesu produkcji lub systemu jakości wytwórcy. Ma uprawnienia do wydawania certyfikatów zgodności, a także do ich zmiany, nakładania ograniczeń, uzupełniania, zawieszania, przywracania ważności i wycofywania dla wszystkich wyrobów medycznych, dla których wydała certyfikaty w zakresie swojej notyfikacji. Przeprowadza kontrole i nadzoruje wytwórców, którym wydała certyfikaty zgodności. Jednostka Notyfikowana uzyskuje numer identyfikacyjny nadany przez Komisję Europejską i zostaje umieszczona w wykazie jednostek, który jest publikowany w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej serii C. W UE każdy wyrób medyczny musi posiadać znak CE, który, po spełnieniu określonych wymagań, jest nadawany przez Jednostkę Notyfikowaną. Wyrób medyczny musi także posiadać niepowtarzalny kod identyfikujący wyrobu (w tzw. systemie Unikalnej Identyfikacji Wyrobów Medycznych, UDI, *ang. Unique Device Identifier*), który umożliwia identyfikację i ułatwia identyfikowalność wyrobów.

Po wprowadzeniu do obrotu producent jest zobowiązany do prowadzenia systemu do aktywnego i systematycznego gromadzenia, zapisywania i analizowania odpowiednich danych dotyczących jakości, działania i bezpieczeństwa wyrobu w całym

jego okresie używania, wyciągania niezbędnych wniosków oraz ustalania, wdrażania i monitorowania wszelkich działań zapobiegawczych i korygujących.

W USA za ustanowienie procesu zatwierdzania i procedury dopuszczania wyrobów medycznych do obrotu odpowiada FDA. W zależności od tego, czy nowe urządzenie medyczne może być klasyfikowane zgodnie z Kodeksem Przepisów Federalnych (21 CFR) czy nie, są stosowane różne procedury rejestracji (rys. 10.8). Jeśli nowe urządzenie może być sklasyfikowane zgodnie z 21 CFR, może przejść zgłoszenie przed wprowadzeniem na rynek zgodnie z procedurą PMA (*Premarket Approval*) lub zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 510 (k). Wyroby medyczne III klasy ryzyka przechodzą przez procedurę PMA. Jeśli nowe urządzenie nie może zostać sklasyfikowane zgodnie z 21 CFR, automatycznie zalicza się je do III klasy ryzyka.



RYS. 10.7.

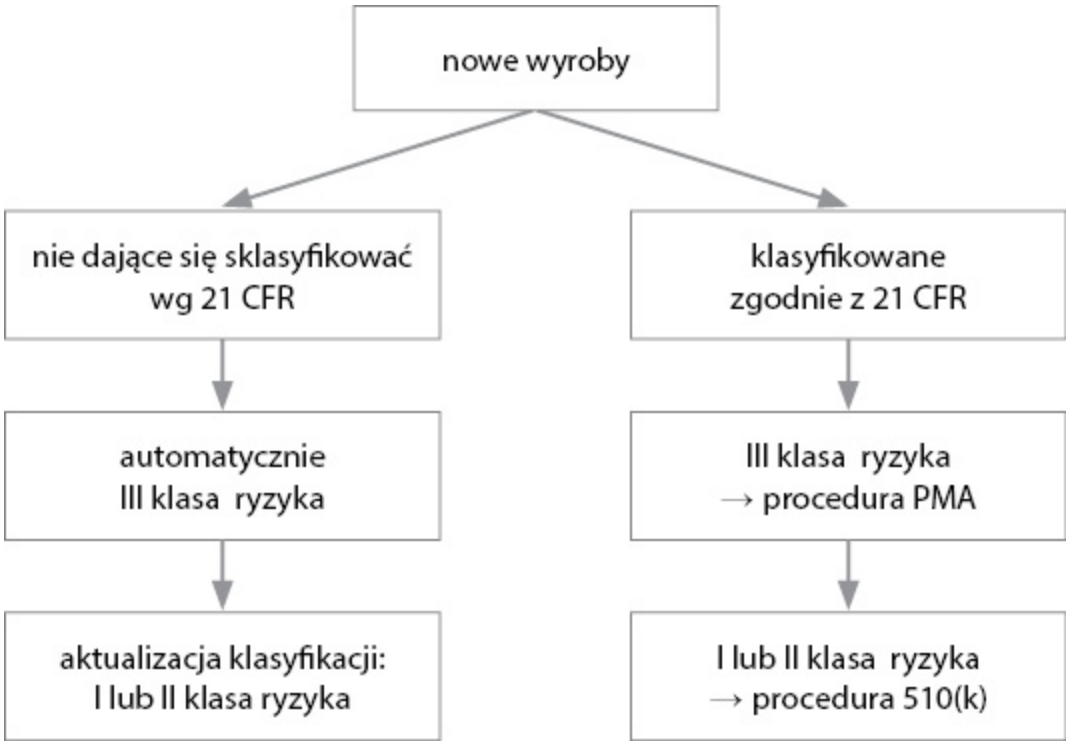
Etapy rejestracji wyrobów medycznych w UE [3]

W procedurze 510 (k) zamierzone przeznaczenie i szczególne parametry techniczne wyrobu oraz bezpieczeństwo i skuteczność są porównywane z już zarejestrowanymi wyrobami. Procedura ta jest stosowana, jeżeli produkt należy do I lub II klasy ryzyka i zdecydowana większość wyrobów z tych dwóch klas ryzyka podlega tej procedurze. Jeśli nowego wyrobu medycznego nie można porównać z żadnym istniejącym wyrobem, to zostanie on automatycznie sklasyfikowany w III klasie ryzyka.

Główne różnice pomiędzy procedurami rejestracyjnymi w USA i UE przedstawiono w tabeli 10.1. Generalnie mimo tych różnic,

rozwój wyrobów medycznych zarówno w UE jak i USA, można podzielić na trzy główne etapy [4]:

1) Etap przed wprowadzeniem na rynek
   - badania i rozwój
   - produkcja
   - pakowanie i etykietowanie
2) Wprowadzenie na rynek
   - reklama
   - sprzedaż
3) Monitorowanie jakości i bezpieczeństwa po wprowadzeniu na rynek
   - użytkowanie
   - utylizacja


nowe wyroby
nie dające się sklasyfikować wg 21 CFR
klasyfikowane zgodnie z 21 CFR
automatycznie III klasa ryzyka
III klasa ryzyka → procedura PMA
aktualizacja klasyfikacji: I lub II klasa ryzyka
I lub II klasa ryzyka → procedura 510(k)

RYS. 10.8

Etapy rejestracji wyrobów medycznych w USA [3]

TABELA 10.1

Różnice pomiędzy procedurami rejestracyjnymi wyrobów medycznych w USA i UE [3]

UE	USA
Rejestracja poprzez deklarację zgodności sporządzoną przez wytwórcę samodzielnie lub z udziałem jednostki notyfikowanej	Rejestracja wyrobów medycznych przez FDA
Brak procedury opartej na udowodnieniu odpowiedniości rejestrowanego wyrobu z wyrobem już zarejestrowanym	Procedura 510(k) oparta na udowodnieniu odpowiedniości rejestrowanego wyrobu z wyrobem już zarejestrowanym
Klasyfikacja wyrobów odbywa się na podstawie Reguł klasyfikacji	Klasyfikacja wyrobów jest wykonywana przez FDA
Rejestracja opiera się na zharmonizowanych normach i dokumentach MEDDEV, które zapewniają producentom indywidualne rozwiązania	Jasno zdefiniowane wytyczne FDA są istotne dla potwierdzenia wymagań

Literatura

1. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego I Rady (UE) 2017/745 z dnia 5 kwietnia 2017 r. w sprawie wyrobów medycznych, zmiany dyrektywy 2001/83/WE, rozporządzenia (WE) nr 178/2002 i rozporządzenia (WE) nr 1223/2009 oraz uchylenia dyrektyw Rady 90/385/EWG i 93/42/EWG.
2. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego I Rady (UE) 2017/746 z dnia 5 kwietnia 2017 r. w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* oraz uchylenia dyrektywy 98/79/WE i decyzji Komisji 2010/227/UE.
3. Wagner M. V. and Thomas Schanze T., „Comparison of approval procedures for medical devices in Europe and the USA, Current Directions”, *Biomed.Engineering*, **5**, 606–608 (2019)
4. Gudeppu M., Sawant S, Chockalingam Ch., G., Srinivasan P. Shanmugam T., „Medical device regulations” w: *Trends in Development of Medical Devices*, red. Srinivasan P., Shanmugam T., Academic Press, 2020, wyd. 1.

5. Overview of Device Regulation na stronie FDA https://www.fda.gov/medical-devices/device-advice-comprehensive-regulatory-assistance/overview-device-regulation
6. Materiały firmy CEMED.INFO sp. z o.o. http://cemed.info/wp-content/uploads/2020/01/reguły-klasyfikacji-schemat.pdf, za zgodą dr inż. Marcina Hryciuka, prezesa firmy (data dostępu 20.01.2021 r.)

Przypisy

[1] Obecnie zabroniony (przyp. red.).

[2] Atto – przedrostek jednostki miar określający 10^{-18} (przyp. red.).